



**Roberto Carlos
Gaspar Gomes
Coelho**

**Extracção Supercrítica de Compostos da Casca de
*Eucalyptus globulus***



**Roberto Carlos
Gaspar Gomes
Coelho**

Extracção Supercrítica de Compostos da Casca de *Eucalyptus globulus*

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Carlos Manuel Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e do Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro do projecto AFORE (CP-IP
228589-2) no âmbito do VII Quadro
Comunitário de Apoio.



afore



SEVENTH FRAMEWORK
PROGRAMME



Dedico este trabalho aos meus pais pelo constante apoio e dedicação.

“Não tentes ser bem-sucedido, tenta antes ser um homem de valor.”

(Albert Einstein)

O júri

Presidente

Professor Doutor José Joaquim Costa Cruz Pinto
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Ricardo Jorge Nogueira dos Santos
Investigador Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da
Universidade do Porto

Professor Doutor Carlos Manuel Santos Silva
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre
Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Aos meus orientadores Professor Doutor Carlos Silva e Professor Doutor Armando Silvestre, pelo acompanhamento e orientação prestados durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Avelino da Silva e ao Doutor Eduardo Oliveira pelo apoio dedicado na utilização do aparelho de extracção supercrítica.

Aos meus colegas dos laboratórios de Engenharia Química e de Química de Agro-Florestais, aos quais agradeço o bom ambiente de trabalho, motivação, boa disposição, conselhos e sugestões.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da Universidade de Aveiro que me proporcionaram as condições adequadas à realização deste trabalho.

E finalmente aos meus pais, família e amigos por me terem acompanhado e incentivado durante a minha carreira académica.

Palavras-chave

Ácidos triterpénicos, biorrefinaria, curva de extracção, extracção supercrítica, *Eucalyptus globulus*, rendimento de extracção.

Resumo

Esta dissertação visou estudar a extracção com dióxido de carbono supercrítico (SFE) de compostos de elevado valor acrescentado da casca de *Eucalyptus globulus*, nomeadamente os ácidos triterpénicos (ácido ursólico, oleanólico, betulínico e betulónico) e os seus derivados acetilados. Para tal foram conduzidas experiências para avaliar a influência das condições operatórias da SFE (pressão, temperatura e percentagem do co-solvente utilizado - etanol) sobre o rendimento e a selectividade da extracção. Realizaram-se extracções com CO₂ supercrítico para combinações de 120 e 200 bar, 40 e 60°C, 0 e 5% de etanol, obtendo-se as respectivas quatro curvas cumulativas de extracção. Foi ainda realizada uma extracção em Soxhlet com diclorometano, que serviu de referência para a avaliação das referidas curvas de extracção. Os extractos obtidos foram analisados por GC-MS.

Os rendimentos globais de extracção dependeram da pressão e temperatura do CO₂, mas muito particularmente do conteúdo em etanol, chegando a duplicar o seu valor após introdução de 5% de álcool. O rendimento de extracção mais elevado (m/m) foi de 0.98% obtido a 200 bar, 60°C com 5% de etanol. Os ácidos triterpénicos foram a família de compostos presentes em maior quantidade nos extractos, correspondendo em média a cerca de metade da sua massa total. Dentro desta fracção encontra-se maioritariamente o ácido 3-acetilursólico, que pode ser hidrolisado para formar ácido ursólico e assim potenciar a sua concentração no extracto, passando-a de cerca de um terço para aproximadamente metade dos ácidos triterpénicos extraídos.

Em todos os casos, os ácidos acetilados e o ácido betulónico foram mais facilmente extraídos por serem menos polares que os ácidos não acetilados. Por exemplo, a 200 bar, 60°C e 5% de etanol foi possível recuperar completamente os ácidos 3-acetilursólico e betulónico e 85% do 3-acetiloleanólico, ao contrário dos restantes ácidos que só foram extraídos até 57% do seu máximo.

Os resultados obtidos, mostram que a extracção supercrítica permite obter um teor mais elevado de ácidos triterpénicos do que métodos convencionais de extracção com solventes orgânicos, embora com rendimentos inferiores.

Keywords

Triterpenic acids, biorefinery, supercritical fluid extraction, *Eucalyptus globulus*, extraction curve, extraction yield

Abstract

This thesis aimed to study the extraction with supercritical carbon dioxide (SFE) of high value compounds from the outer bark of *Eucalyptus globulus*, namely triterpenic acids (ursolic, oleanolic, betulinic and betulonic) and their acetylated derivatives. For this propose, experiments have been carried out to evaluate the influence of operating conditions of SFE (pressure, temperature and co-solvent content- ethanol) on the extraction yield and selectivity. Four SFE extractions with combinations of 120 and 200 bar, 40 and 60 °C, 0 and 5% ethanol were carried out and the corresponding cumulative extraction curves were plotted. A Soxhlet extraction was also carried out, to be used as reference for the analysis of the extraction curves. The extracts obtained were analyzed by GC-MS.

The overall extraction yields depended on the pressure and temperature of CO₂, but particularly on the ethanol content, doubling its value after the introduction of 5% alcohol. The highest yield (w/w) was 0.98% obtained at 200 bar, 60 °C with 5% ethanol. Triterpenic acids were the family of compounds present in higher amounts in the extracts, corresponding to about 50% of the total mass. This fraction is mainly constituted by 3-acetylursolic acid, which may be hydrolyzed to ursolic acid and thus increase its final concentration in the extract, from one third to nearly one half of the triterpenic acids extracted.

In all cases, the acetylated acids and the betulonic acid were easily removed due their lower polarity when compared to the non-acetylated ones. For example, at 200 bar, 60 °C and 5% ethanol it was possible to remove completely 3-acetylursolic and betulonic acids, and 85% of 3-acetyloleanolic acid, whereas only ~ 57% of the non acetylated ones were extracted.

The results obtained, show that the supercritical extraction allows to obtain extracts with higher contents in triterpenic acids, when compared to conventional although in lower yields.

Conteúdos

Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	iii
Nomenclatura	iv
Capítulo 1 - Enquadramento e objectivos	1
Capítulo 2 - Introdução	3
2. 1 - Fluidos e tecnologias supercríticos	3
2. 2 - Extractáveis	9
2. 3 - Extracção em Soxhlet	12
2. 4 - Cromatografia em fase gasosa acoplada com espectrometria de massa	14
Capítulo 3 - Procedimentos experimentais	17
3. 1 - Químicos e materiais	17
3. 2 - Recolha e preparação da casca para extracção	18
3. 3 - Extracção em Soxhlet	18
3. 4 - Extracção com CO ₂ supercrítico	18
3. 5 - Derivatizações e análise por GC-MS	20
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	22
4. 1 - Rendimento global das extracções em Soxhlet e Supercrítico	22
4. 2 - Identificação por GC-MS dos ácidos triterpénicos	23
4. 3 - Quantificação dos compostos extraídos	29
4. 4 - Extracção supercrítica de ácidos triterpénicos	31
4. 4. 1 - Comportamento da extracção ao longo do tempo	31
4. 4. 2 - Comportamento da extracção de ácidos triterpénicos ao longo do tempo	35
Capítulo 5 - Conclusões e trabalho futuro	40
Referências	43

Lista de Figuras

FIGURA 1 – DIAGRAMA DE FASES ILUSTRANDO A ZONA DE FLUIDO SUPERCRÍTICO [10].	3
FIGURA 2 – EVOLUÇÃO DO EQUILÍBRIO LÍQUIDO-VAPOR ATÉ ATINGIR O PONTO CRÍTICO (ADAPTADO DE [8]).	4
FIGURA 3 – DIAGRAMA GENÉRICO DE VARIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE UMA SUBSTÂNCIA POUCO VOLÁTIL EM FUNÇÃO DO AUMENTO DA TEMPERATURA DO FLUIDO SOLVENTE, PARA DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRESSÃO (ADAPTADO DE [9]).	5
FIGURA 4 – ESQUEMA GENÉRICO DE UM PROCESSO DE EXTRACÇÃO COM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.	8
FIGURA 5 – CURVAS DE EXTRACÇÃO DO ÓLEO DAS SEMENTES DE COLZA USANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO COMO SOLVENTE.	9
FIGURA 6 – ABUNDÂNCIA DOS DIFERENTES TIPOS DE EXTRACTÁVEIS PRESENTES NA CASCA INTERNA DO <i>E. GLOBULUS</i> (FA - ÁCIDOS GORDOS, LCAA - ÁLCOOIS ALIFÁTICOS DE CADEIA LONGA, TT - TRITERPENÓIDES, ST - ESTERÓIS), ANTES E DEPOIS DE HIDRÓLISE ALCALINA (ADAPTADO DE [7]).	10
FIGURA 7 – ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NA CASCA DE <i>E. GLOBULUS</i> [6].	11
FIGURA 8 – ABUNDÂNCIA DOS DIFERENTES TIPOS DE EXTRACTÁVEIS PRESENTES NA CASCA EXTERNA DO <i>E. GLOBULUS</i> (FA - ÁCIDOS GORDOS, LCAA - ÁLCOOIS ALIFÁTICOS DE CADEIA LONGA, TT - TRITERPENÓIDES, ST - ESTERÓIS), ANTES E DEPOIS DE HIDRÓLISE ALCALINA [10].	12
FIGURA 9 - MONTAGEM EXPERIMENTAL DE UM EXTRACTOR SOXHLET [46].	13
FIGURA 10 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UM GC.	14
FIGURA 11 – ESQUEMATIZAÇÃO DO CONCEITO DE ANÁLISE BASEADA EM ESPECTROMETRIA DE MASSA.	15
FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EQUIPAMENTO DE EXTRACÇÃO SUPERCRÍTICA, UTILIZADO NESTE TRABALHO.	20
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DO EXTRACTO DERIVATIZADO OBTIDO DA CASCA DE <i>E. GLOBULUS</i> POR EXTRACÇÃO SUPERCRÍTICA (CONDIÇÕES: 200 BAR, 60°C E 5% ETANOL).	24
FIGURA 14 – ESPECTRO DE MASSA DO DERIVADO TMS DO ÁCIDO URSÓLICO.	26
FIGURA 15 – ESPECTRO DE MASSA DO DERIVADO TMS DO ÁCIDO OLEANÓLICO.	26
FIGURA 16 - ESTRUTURA TIPO URSANO (R1=CH ₃ E R2= CH ₃) E TIPO OLEANANO (R1=2CH ₃ E R2= H).	27
FIGURA 17 - ESPECTRO DE MASSA DO DERIVADO TMS DO ÁCIDO BETULÍNICO.	28
FIGURA 18 - ESPECTRO DE MASSA DO DERIVADO TMS DO ÁCIDO BETULÓNICO.	28
FIGURA 19 ESTRUTURA DO TIPO ÁCIDO BETULÍNICO (R1=TMSO) E ÁCIDO BETULÓNICO (R1=O).	28
FIGURA 20 – CURVAS CUMULATIVAS DE EXTRACÇÃO DA CASCA EXTERNA MORTA DO <i>EUCALYPTUS GLOBULUS</i> .	32
FIGURA 21 – CURVAS CUMULATIVAS DE EXTRACÇÃO DOS ÁCIDOS TRITERPÉNICOS PRESENTES NA CASCA EXTERNA MORTA DO <i>EUCALYPTUS GLOBULUS</i> : ÁCIDOS BETULÍNICO, BETULÓNICO, URSÓLICO, OLEANÓLICO, 3-ACETILURSÓLICO E 3-ACETILOLEANÓLICO.	33
FIGURA 22 - QUANTIDADE DOS TIPOS DE EXTRACTÁVEIS OBTIDOS DA CASCA DE <i>E. GLOBULUS</i> POR EXTRACÇÃO SUPERCRÍTICA (CONDIÇÕES: 200 BAR, 60°C E 5%ETANOL) E POR SOXHLET. (A.G. – ÁCIDOS GORDOS, A.A.C.L – ÁLCOOIS ALIFÁTICOS DE CADEIA LONGA, A.TT – ÁCIDOS TRITERPÉNICOS, TT.N.I – TRITERPENÓIDES NÃO IDENTIFICADOS, N.I. – NÃO IDENTIFICADOS, ND – NÃO DETECTADOS).	34
FIGURA 23 - CURVAS DE EXTRACÇÃO DE ÁCIDOS TRITERPÉNICOS ACETILADOS E NÃO ACETILADOS. CONDIÇÕES: 200 BAR 60°C, 0% ETANOL (À DIREITA) E 120BAR, 40°C, 0% ETANOL (À ESQUERDA).	35

FIGURA 24 - CURVAS DE EXTRACÇÃO DE ÁCIDOS TRITERPÉNICOS ACETILADOS E NÃO ACETILADOS. CONDIÇÕES: 200 BAR, 60°C, 5% ETANOL (À DIREITA) E 120 BAR, 40°C, 5% ETANOL (À ESQUERDA).	36
FIGURA 25 - CURVAS DE EXTRACÇÃO PARA CADA ÁCIDO TRITERPÉNICO A 200BAR 60°C E 5% ETANOL.....	38
FIGURA 26 - CURVAS DE EXTRACÇÃO PARA CADA ÁCIDO TRITERPÉNICO A 200 BAR 60°C E 5% ETANOL, NORMALIZADAS PELOS VALORES OBTIDOS POR SOXHLET	38

Lista de Tabelas

TABELA 1 – VALORES TÍPICOS DAS PROPRIEDADES DE UM FLUIDO NOS ESTADOS GASOSO, LÍQUIDO E SUPERCRÍTICO (ADAPTADO DE [9]).	5
TABELA 2 - POSSÍVEIS APLICAÇÕES DE ALGUNS ÁCIDOS TRITERPÉNICOS.	10
TABELA 3 – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E TEMPO DE EXTRACÇÃO.	19
TABELA 4 – RENDIMENTOS TOTAIS OBTIDOS COM CADA CONJUNTO DE CONDIÇÕES.	23
TABELA 5 – COMPOSTOS EXTRAÍDOS E RESPECTIVOS TEMPOS DE RETENÇÃO E QUANTIDADES NO EXTRACTO OBTIDO.	25
TABELA 6 – COMPOSTOS EXTRAÍDOS, RESPECTIVOS TEMPOS DE RETENÇÃO E QUANTIDADES OBTIDAS.	29
TABELA 7 – PONTOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRACÇÃO.....	31
TABELA 8 – QUANTIDADES EXTRAÍDAS (EM MG/KG DE CASCA) DE ÁCIDOS TRITERPÉNICOS ACETILADOS E NÃO ACETILADOS, OBTIDOS AO LONGO DO TEMPO DE EXTRACÇÃO, PARA AS QUATROS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DESTE TRABALHO.	35
TABELA 9 - EXTRACTO DE CADA ÁCIDO TRITERPÉNICO OBTIDO AO LONGO DO TEMPO, A 200BAR 60°C E 5% ETANOL.....	37

Nomenclatura

AACL ou LCCA	Álcoois alifáticos de cadeia longa
AG ou FA	Ácidos gordos
ATT	Ácidos triterpénicos
GC	Cromatografia em fase gasosa
MS	Espectrometria de massa
N.D.	Compostos não detectados
n.i.	Compostos não identificados
P	Pressão (bar, MPa)
P _c	Pressão crítica (bar, MPa)
ST	Esteróis
T	Temperatura (°C)
T _c	Temperatura crítica (°C)
TT	Triterpenos
TT.n.i.	Triterpenos não identificados

Capítulo 1 - Enquadramento e objectivos

A procura actual crescente de substâncias biologicamente activas tem fomentado a investigação da sua extracção a partir de uma grande diversidade de matérias-primas vegetais, frequentemente com recurso a tecnologias *verdes* não convencionais. Apesar de a extracção sólido-líquido com solventes orgânicos poder ser usada para este fim, ela é pouco selectiva, podendo inclusivamente originar a produção de resíduos indesejados e o extracto sofrer transformações oxidativas durante a recuperação do solvente [1]. Por estes motivos têm sido cada vez mais analisadas técnicas alternativas como extracção assistida por microondas [2] ou por ultra-sons [3] e extracção com fluidos supercríticos [1]. Esta última tem sido a que mais se destaca no contexto actual de implementação do conceito de biorrefinaria, tanto a nível de investigação como em novas aplicações industriais e/ou à escala piloto [4].

A indústria portuguesa de pasta para papel produz em média 500 mil toneladas por ano de pasta, o que gera cerca de 100 mil toneladas de casca resultante do processo prévio de descasque. Ora estes resíduos de casca derivam, na sua quase totalidade, de *Eucalyptus globulus*, dado que é a espécie mais usada por esta indústria. O destino final da casca é usualmente a queima para gerar energia. Nos últimos anos o Departamento de Química da Universidade de Aveiro tem investido na pesquisa e desenvolvimento de processos com vista à geração de produtos de valor comercial acrescentado a partir desta biomassa [5-7]. Da investigação efectuada concluiu-se que a casca de eucalipto contém compostos com elevada capacidade anti-oxidante e biológica, nomeadamente os ácidos triterpénicos ursólico, oleanólico, betulínico e betulónico, e os derivados acetilados dos três primeiros.

Esta dissertação insere-se neste contexto, visando continuar e ampliar os estudos já realizados. Assim, o objectivo principal deste trabalho é a extracção supercrítica de ácidos triterpénicos dos resíduos da casca de *Eucalyptus globulus*, de forma a investigar as condições operatórias da extracção, nomeadamente a pressão, temperatura e percentagem de co-solvente (etanol) a utilizar como modificador polar do dióxido de carbono.

O trabalho realizado está dividido neste documento em cinco capítulos.

No Capítulo 2, apresentado a seguir, faz-se uma introdução geral ao trabalho, abordando-se brevemente conceitos relativos à extracção e solventes supercríticos, aos extractáveis da casca de *Eucalyptus globulus*, aspectos relativos à extracção em Soxhlet, e à cromatografia em fase gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC-MS).

O Capítulo 3 contém a parte experimental do trabalho. Descrevem-se os procedimentos experimentais, os químicos e materiais utilizados, a metodologia de recolha e preparação da casca e o equipamento utilizado.

No Capítulo 4 são discutidos os resultados obtidos, nomeadamente a identificação e quantificação por GC-MS dos compostos existentes nos extractos supercríticos, os rendimentos e as curvas cumulativas de extracção.

Por fim, no Capítulo 5 compilam-se as principais conclusões tiradas com a elaboração desta dissertação, bem como algumas sugestões para trabalho futuro.

Capítulo 2 - Introdução

Neste capítulo são abordados os conceitos necessários para uma melhor compreensão do trabalho realizado no âmbito desta dissertação, mais concretamente a tecnologia e aplicações que utilizam fluidos supercríticos e métodos de extracção, os compostos com interesse para esta tese (ácidos triterpénicos), e os métodos analíticos utilizados para detectar e quantificar os extractáveis da casca do *Eucalyptus globulus*.

2.1 - Fluidos e tecnologias supercríticos

Pela sua adequabilidade ao processo de extracção de compostos lipofílicos existentes na casca do *Eucalyptus globulus*, a extracção com fluidos supercríticos foi a técnica escolhida para levar a cabo este trabalho. Por este motivo seguir-se-á uma breve introdução aos fluidos supercríticos e suas aplicações.

Fluidos supercríticos e suas propriedades. Um fluido que se encontra a temperatura e pressão acima do ponto crítico (T_c , P_c) denomina-se por supercrítico. Este ponto assinala os máximos de temperatura e pressão aos quais essa substância pode apresentar um equilíbrio líquido-vapor [8, 9].

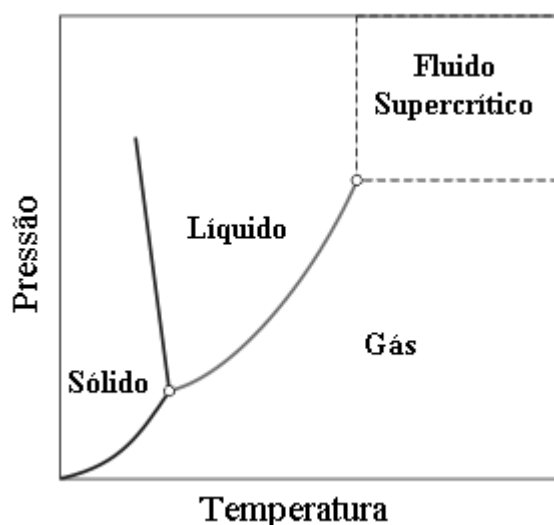


Figura 1 – Diagrama de Fases ilustrando a zona de fluido supercrítico [10].

A Figura 1 mostra um diagrama genérico que exemplifica a variação do estado físico de um fluido em função da pressão e temperatura, mostrando assim a sua evolução desde o estado sólido até ao supercrítico. As curvas representam os equilíbrios entre duas fases e o ponto triplo indica que naquela condição as três fases triviais se encontram em equilíbrio. Ao subir a pressão e temperatura ao longo da curva de ebulição (equilíbrio líquido-vapor), vai ocorrer uma diminuição da densidade do líquido devido à expansão térmica, e o gás vai-se tornando mais denso com o aumento da pressão. Estes acontecimentos podem fazer com que as densidades das duas fases convirjam numa só e deixe de haver distinção entre líquido e gás, passando a existir apenas uma fase denominada de supercrítica [8, 9]. A evolução do dióxido de carbono em equilíbrio líquido-vapor para o estado de fluido supercrítico pode ser visualizada através da Figura 2.

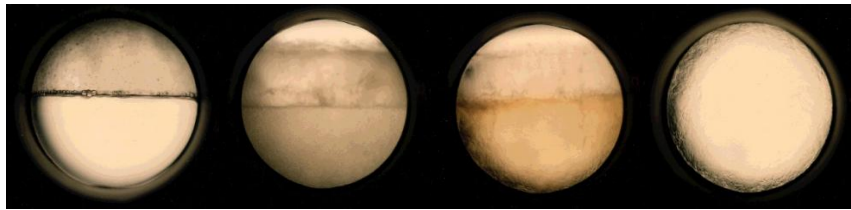


Figura 2 – Evolução do equilíbrio líquido-vapor até atingir o ponto crítico (adaptado de [8]).

Quando um fluido atinge o estado supercrítico a sua densidade tende para a de um líquido, enquanto a viscosidade se aproxima da de um gás, como se pode verificar pelos dados da Tabela 1. Quanto à difusividade, esta apresenta-se superior em duas ordens de grandeza à dos líquidos comuns [9]. Ora, o poder solvente depende fortemente da densidade do fluido e, por isso, é possível delinear condições para extrair um soluto particular recorrendo ao controlo da densidade do fluido pela manipulação da pressão e temperatura de operação. A solubilidade no fluido depende ainda da quantidade de solutos presente na mistura a extrair, isto porque cada soluto se comporta como um “*entrainer*”. *Daintree et al.* sugerem que um soluto mais solúvel provoca um aumento da solubilidade de solutos menos solúveis, pelo que o inverso também será válido [11].

Tabela 1 – Valores típicos das propriedades de um fluido nos estados gasoso, líquido e supercrítico (adaptado de [9]).

Estado Correspondente	Densidade (g/cm ³)	Difusividade (cm ² /s)	Viscosidade (g.s/cm ²)
Gás $P = 1atm$, $T = 15-30^{\circ}C$	$(0.6 - 2.0) \cdot 10^{-3}$	0.1 – 0.4	$(0.6 - 2.0) \cdot 10^{-4}$
Líquido $P = 1atm$, $T = 15-30^{\circ}C$	0.6 – 1.6	$(0.2 - 2.0) \cdot 10^{-5}$	$(0.2 - 3.0) \cdot 10^{-2}$
Fluido Supercrítico $P = P_c; T \approx T_c$ $P = 4P_c; T \approx T_c$	0.2 – 0.5	$0.7 \cdot 10^{-3}$	$(1 - 3) \cdot 10^{-4}$
	0.4 – 0.9	$0.2 \cdot 10^{-3}$	$(3 - 9) \cdot 10^{-4}$

Como se pode ver na Figura 3, operando acima de pressões intermédias (cerca de 10 MPa), à medida que a temperatura do fluido solvente aumenta, a solubilidade do soluto nesse fluido é cada vez maior, mas se a pressão for substancialmente reduzida o aumento da temperatura faz diminuir a quantidade de soluto dissolvida devido à redução da densidade do fluido, o que significa que o soluto pode ser removido do fluido supercrítico por simples expansão térmica à pressão atmosférica [4, 9, 12].

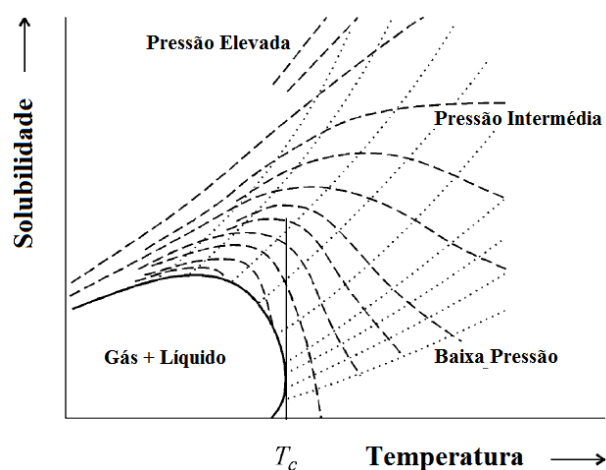


Figura 3 – Diagrama genérico de variação da solubilidade de uma substância pouco volátil em função do aumento da temperatura do fluido solvente, para diferentes condições de pressão (adaptado de [9]).

Tecnologias de processamento supercrítico. O processo de precipitação do soluto através da expansão brusca do fluido supercrítico designa-se por RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solutions*), e é com este processo que se consegue a formação de partículas na forma de pequenos grãos de pó muito finos e com distribuição de tamanhos reduzida. Este facto é de grande interesse para a indústria farmacêutica, mais concretamente para a produção de formulações usadas em pulverizadores e inaladores [4, 12, 13]. No entanto, mesmo que o soluto não seja solúvel no fluido supercrítico é possível aplicar um processo de precipitação denominado por SAE (*Supercritical Anti-Solvent Extraction*), onde uma solução formada por um solvente convencional e um soluto contacta com o fluido supercrítico, que actua como anti-solvente, originando uma expansão do volume e consequentemente um abaixamento do poder solvente e a precipitação do soluto [4, 12, 13].

Contudo, o potencial solvente destes fluidos pode ainda ser ampliado pela adição de pequenas quantidades de co-solventes polares. *Cocero e Calvo [14]* detectaram que adicionando uma baixa percentagem de etanol ao dióxido de carbono supercrítico se obtinha um aumento considerável na solubilidade de compostos relativamente polares, que não são solúveis em dióxido de carbono supercrítico devido à sua baixa polaridade. No entanto é preciso um ajuste na percentagem de co-solvente utilizado, no sentido de não dissolver também substâncias indesejáveis. A grande vantagem da utilização de co-solventes é a possibilidade de operar a pressões mais baixas para solubilizar compostos polares [11, 14]. Mas já em 1987 *Dobbs et al.* referiam que também a selectividade neste tipo de processo pode ser regulada com base nos grupos funcionais do co-solvente polar adicionado ao fluido supercrítico [1, 15, 16].

A técnica de extracção com fluidos supercríticos tem sido bastante aplicada actualmente no ramo da investigação, mais concretamente na extracção de componentes de valor acrescentado que se encontram em diversas plantas. São exemplos disso o óleo da grainha da uva [17, 18], o óleo de sementes de girassol [14], a remoção dos fosfolípidos da canola [16], o óleo de avelã para produção de biodiesel [19] e os pigmentos extraídos de microalgas para produção de corantes alimentares [20]. Além disso, esta técnica já é comercialmente utilizada para o processamento de

produtos com os quais lidamos no quotidiano, por exemplo, na remoção de gordura dos alimentos, como é o caso das batatas fritas, extracção de especiarias, isolamento de fragrâncias e descafeinação do chá e do café [9]. Sendo que esta última aplicação é a mais usada na indústria, com centenas de milhares de toneladas de café e chá a serem processadas anualmente [11, 22].

Outra importante aplicação é a gasificação de biomassa em água supercrítica. Neste processo a água supercrítica reage com a biomassa, produzindo uma corrente com elevado potencial combustível, contendo hidrogénio e metano. É ainda um processo bastante recente mas revela um potencial promissor [23].

Os fluidos supercríticos também têm vindo a ganhar importância como uma alternativa económica e sustentável à utilização de solventes orgânicos na síntese de químicos. Além disto, as reacções em meio supercrítico colocam a possibilidade de otimizar e controlar o ambiente reaccional, por simples alterações de temperatura, pressão e densidade do fluido, o que resulta numa possível manipulação da velocidade de reacção e eliminação das limitações difusionais [11].

O fluido que mais se destaca pela sua utilização em aplicações supercríticas é o dióxido de carbono, pelo facto de apresentar inúmeras vantagens que se enquadram perfeitamente nesta tecnologia.

Dióxido de carbono supercrítico. Os solventes orgânicos convencionais têm sido apontados recentemente como causa de muitos problemas ambientais, como efeitos poluentes com impactes negativos sobre os ecossistemas, bem como sobre a saúde humana. Devido a estes factos a sociedade força agora a indústria a mudar os seus hábitos e a virar-se para soluções alternativas menos problemáticas [4, 24]. Ora, o dióxido de carbono supercrítico é a alternativa actual mais em foco com vista a substituir esses solventes, uma vez que a sua capacidade solvente se assemelha à de líquidos orgânicos não polares, podendo por isso solubilizar compostos pouco ou nada polares de baixo peso molecular [4]. Outra vantagem do dióxido de carbono supercrítico é o facto de ser uma substância não tóxica, não inflamável, não corrosiva, e disponível em grandes quantidades com elevada pureza e baixo custo [9, 13, 17].

O processamento deste fluido, em extracção supercrítica, é relativamente fácil, pois pode ser feito a pressões razoáveis e a temperaturas não muito superiores às ambientais ($P_c = 73 \text{ bar}$ e $T_c = 31^\circ\text{C}$ [25]). Isto permite o tratamento de materiais susceptíveis de degradação térmica. Quanto à sua separação do soluto, é feita quase que instantaneamente por expansão térmica à pressão atmosférica [9, 11, 13]. Pode ainda ser reciclado e assim diminuir a sua contribuição para problemas ambientais e custos de operação [9].

A Extracção Supercrítica de matrizes sólidas, com dióxido de carbono supercrítico, é normalmente realizada em semi-contínuo em colunas de leito fixo onde o fluido supercrítico percola através do leito, solubilizando os compostos do substrato de forma extraí-los até ao esgotamento. O poder solvente do fluido supercrítico depende das condições de operação, sobretudo da temperatura, pressão e quantidade de co-solvente adicionada. Depois da extracção propriamente dita, a corrente de extracto passa por uma válvula que provoca uma perda de carga suficiente para reduzir drasticamente a solubilidade dos solutos, entretanto recolhidos num vaso acumulador (precipitador). Após isto o gás é re-comprimido e reencaminhado ao processo (Figura 4). As perdas de solvente são compensadas com solvente de *make-up*.

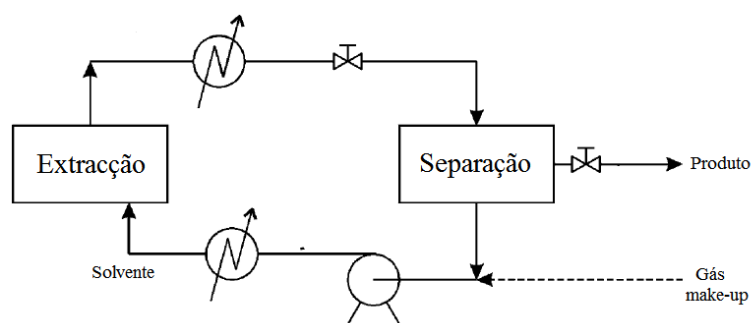


Figura 4 – Esquema genérico de um processo de extracção com fluidos supercríticos.

O registo da extracção pode ser feito por determinação da quantidade de extracto acumulada no recipiente de recolha em função do tempo ou da quantidade de solvente utilizada. Este acompanhamento é usualmente apresentado na forma de

curvas de extracção, como a que se mostra na Figura 5. A primeira parte da curva é frequentemente linear, o que significa que a velocidade de extracção é constante naquele período, enquanto na segunda parte essa velocidade diminui até que um patamar de quantidade extraída é atingido, o que fornece a informação da quantidade máxima de compostos que se podem extrair nas condições adaptadas.

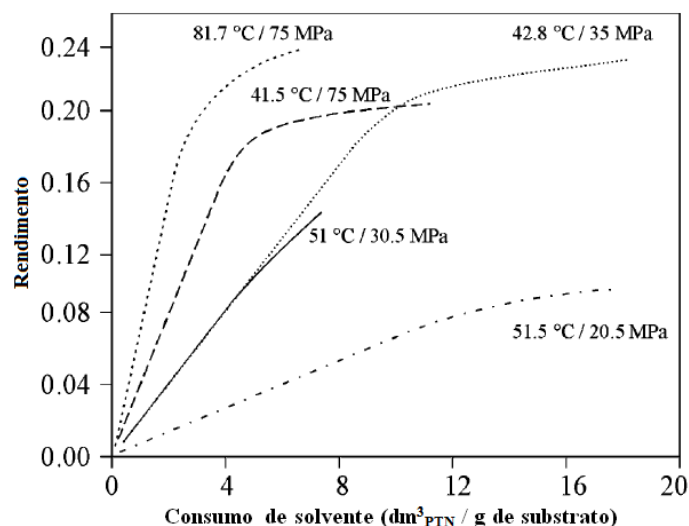


Figura 5 – Curvas de extracção do óleo das sementes de colza usando dióxido de carbono supercrítico como solvente.

2. 2 - Extractáveis

Os fluidos supercríticos, mais concretamente o dióxido de carbono supercrítico, são solventes adequados para a extracção de compostos lipofílicos, como ácidos gordos, ceras, álcoois, terpenos, esteróis, glicerídeos, etc [26]. A casca externa de algumas espécies de eucalipto é rica em compostos das famílias acima referidas, nomeadamente em ácidos triterpénicos como o ácido ursólico, ácido betulínico e ácido oleanólico [6, 7]. O elevado valor comercial atribuído a estes compostos resulta da sua possível utilização no desenvolvimento de agentes bio-activos bastante promissores, como é caso dos ácidos ursólico e oleanólico, que possuem propriedades antitumorais e antiangiogénicas, e o caso do ácido betulínico, que apresenta também propriedades antitumorais e é um precursor de medicamentos anti-VIH (vírus da imunodeficiência humana) [6]. Na Tabela 2 encontram-se algumas das possíveis aplicações destes compostos.

Tabela 2 - Possíveis aplicações de alguns ácidos triterpénicos.

Composto	Aplicações Farmacológicas / Actividade Biológica
Ácido ursólico	Antimicrobiano [27] Antibacteriano [28, 29] Antitumoral [30-35] Antiulceroso [36] Anti-inflamatório [30, 37] Antioxidante [38]
Ácido oleanólico	Antimicrobiano [39, 40] Antibacteriano [28] Anti-VIH [41] Antitumoral [30, 31] Anti-inflamatória [30, 37]
Ácido betulínico	Antitumoral [34] Antivírica (Anti-VIH) [42]
Ácido betulónico	Antitumoral [42] Antioxidante [42]

Num estudo realizado por *Freire et al.* [7] sobre extractáveis lipofílicos da casca externa e interna de *Eucalyptus globulus*, demonstrou-se que o seu teor na casca interna é significativamente diferente da casca externa, cerca de nove vezes inferior [7]. O estudo citado revela ainda a composição de cada região da casca. A casca interna é rica em esteróis e triterpenóides, com β -sitosterol e β -amirina como compostos livres mais abundantes. Existe também algum teor em β -sitostanol e lupeol [7, 43, 44]. Esta região da casca apresenta ainda pequenas quantidades de ácidos gordos, mas não contém quaisquer ácidos triterpénicos. Na figura 6 podem comparar-se as abundâncias de cada família de compostos extraídos da casca interna.

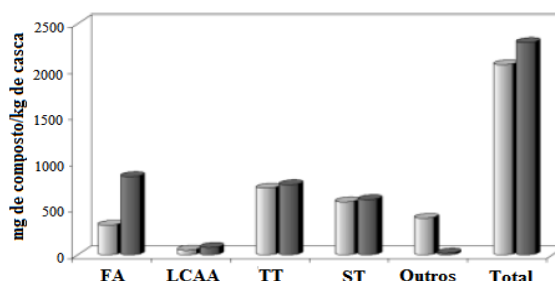


Figura 6 – Abundância dos diferentes tipos de extractáveis presentes na casca interna do *E. globulus* (FA - Ácidos Gordos, LCAA - Álcoois alifáticos de cadeia longa, TT – Triterpenóides, ST - Esteróis), antes e depois de hidrólise alcalina (adaptado de [7]).

A casca externa de *E. globulus*, pelo contrário, é muito rica em ácidos triterpénicos, nomeadamente em estruturas do tipo lupano, ursano e oleanano, como os ácidos betulónico, betulínico, 3-acetilbetulínico, ursólico, 3-acetilursólico, oleanólico e 3-acetiloleanólico [7] (mostradas na Figura 7), seguido de quantidades inferiores de β -sitosterol. A quantidade de ácidos gordos não difere muito de região para região da casca.

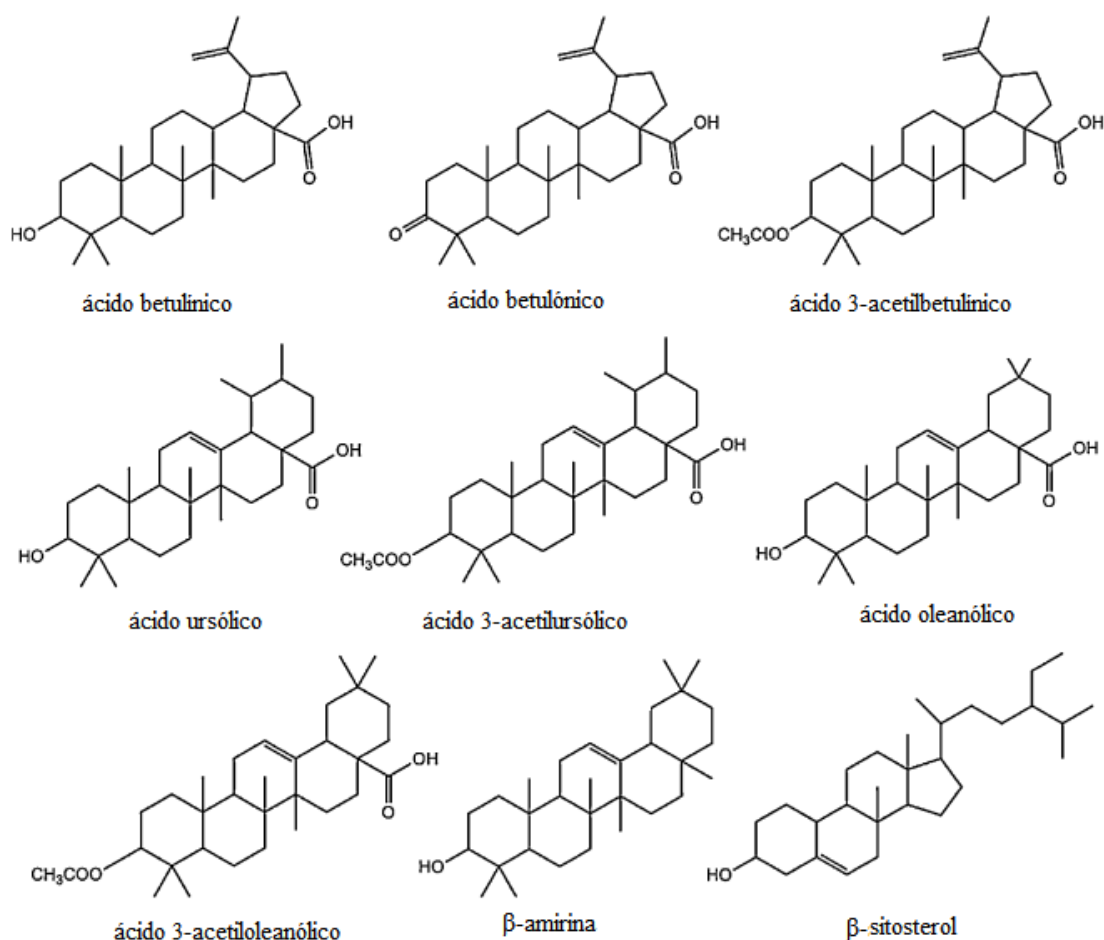


Figura 7 – Estrutura dos principais compostos identificados na casca de *E. globulus* [6].

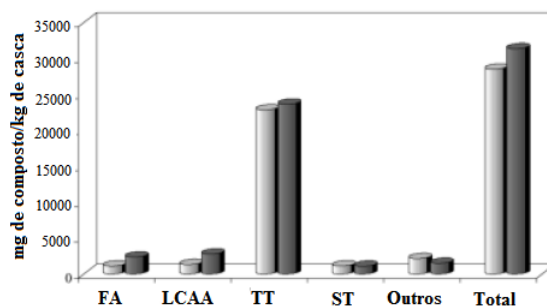


Figura 8 – Abundância dos diferentes tipos de extractáveis presentes na casca externa do *E. globulus* (FA - Ácidos Gordos, LCAA - Álcoois alifáticos de cadeia longa, TT – Triterpenóides, ST - Esteróis), antes e depois de hidrólise alcalina [10].

Através da comparação dos gráficos das figuras 6 e 8 facilmente se pode concluir que é muito mais vantajoso efectuar extracção de compostos lipofílicos à casca externa do *E. globulus*, uma vez que apresenta um teor em triterpenóides de cerca de 25000 mg/kg de casca externa, enquanto esse teor é de menos de 1000 mg/kg de casca interna.

A hidrólise alcalina ao extracto obtido por Soxhlet não apresenta resultados significativos em relação aos compostos de grande valor.

2. 3 - Extracção em Soxhlet

A extracção em Soxhlet é uma técnica laboratorial bem estabelecida e usada como termo de comparação na avaliação da eficiência de outras técnicas de extracção sólido-líquido [26, 45].

O procedimento de extracção num sistema Soxhlet é relativamente simples e o esquema de montagem do equipamento pode ser visualizado na Figura 9. Primeiro a matéria sólida é empacotada num cartucho próprio. O solvente, que pode ser diclorometano, n-hexano ou outro solvente orgânico, é introduzido num balão que, em contacto com uma manta de aquecimento, executa a função de reebulidor. O solvente, evaporado, sobe até ao condensador, muda de fase e enche a câmara de extracção, contactando com o material sólido e solubilizando os solutos. O sifão existente permite descarregar ciclicamente o extracto no reebulidor. O processo desenvolve-se continuamente até que o material sólido fique livre de soluto [45], permitindo assim uma economia de solvente.

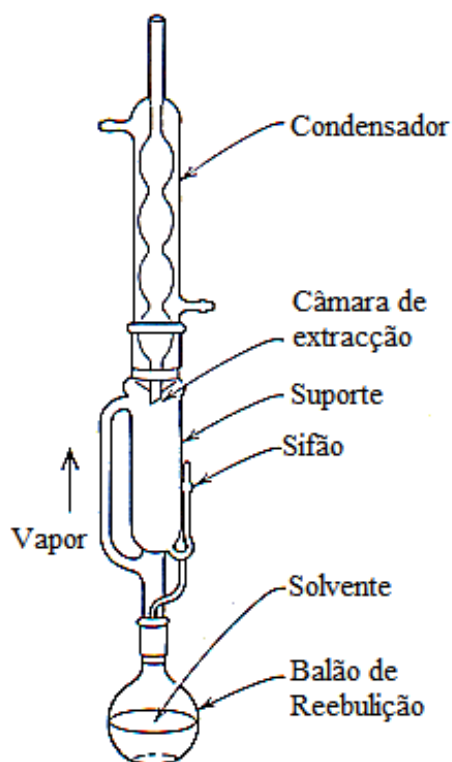


Figura 9 - Montagem experimental de um extrator Soxhlet [46].

A escolha do solvente a utilizar neste processo tem de ser feita de acordo com as características dos solutos que se desejam extrair, pois a quantidade e composição de solutos extraídos varia de solvente para solvente. Assim, podem ser realizadas extracções sequenciais variando o solvente conforme a sua selectividade para os compostos que se querem extrair numa determinada sequência.

A eficiência deste tipo de extracção depende ainda das características do sólido empacotado, nomeadamente do tamanho das partículas e da difusão interna do solvente nas mesmas. Este pode ser o passo limitante no processo de solubilização dos solutos pretendidos [45].

Neste trabalho será utilizado o diclorometano como solvente, uma vez que é apropriado para compostos lipofílicos, como é sugerido na literatura [6, 7].

2. 4 - Cromatografia em fase gasosa acoplada com espectrometria de massa

As diversas formas de cromatografia envolvem o fraccionamento e distribuição dos compostos entre duas fases, uma fase móvel e outra estacionária. A cromatografia em fase gasosa (GC - Gas Chromatography) distingue-se dos outros tipos de cromatografia por envolver um gás inerte (ou gás de arrasto) como fase móvel e um líquido de elevado peso molecular (elevado ponto de ebulição) como fase estacionária quimicamente ligado às paredes da coluna [47-49].

Num GC é comum utilizar-se hélio, hidrogénio ou azoto como gases de arrasto, sendo que neste trabalho foi utilizado o hélio. A amostra é injectada em condições de temperatura que assegurem a volatilização dos compostos a separar, sendo distribuídos e fraccionados pelas fases móvel e estacionária fazendo com que saiam da coluna em tempos diferentes, ou seja, quanto mais solúvel na fase estacionária for um composto mais tempo ficará retido na coluna. À saída da coluna está um detector que regista, num cromatograma, o soluto que o atravessa, de forma proporcional à sua concentração. Este cromatograma distingue os vários compostos por picos assinalados nos respectivos tempos de retenção, e ainda permite uma comparação quantitativa entre os mesmos através da área de cada pico [47]. Na figura 10 pode ser visualizado um esquema de um aparelho de GC.

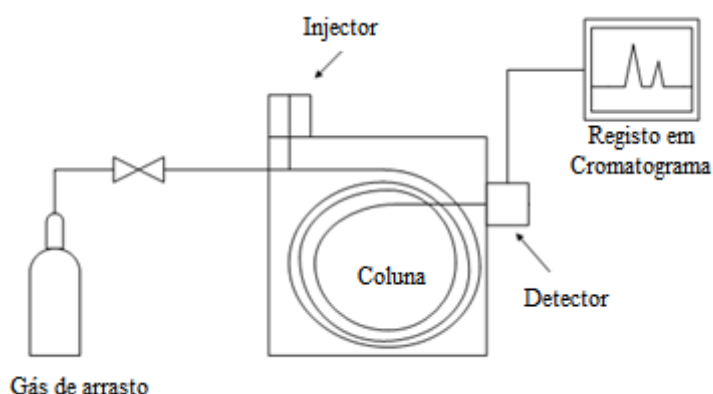


Figura 10 - Esquema simplificado de um GC.

A técnica de GC permite apenas obter informação sobre os tempos de retenção dos compostos, o que não permite uma identificação absoluta e fiável dos compostos presentes na amostra analisada. O acoplamento de detectores como a espectrometria de massa (MS – Mass Spectrometry), que permite obter informação espectroscópica sobre os compostos, possibilita a recolha de dados determinantes para a identificação dos compostos eluídos.

A espectrometria de massa aplica-se a iões, não sendo realizável com espécies neutras. Na figura 11 representa-se o funcionamento simplificado desta técnica, que pode ser descrito em alguns passos.

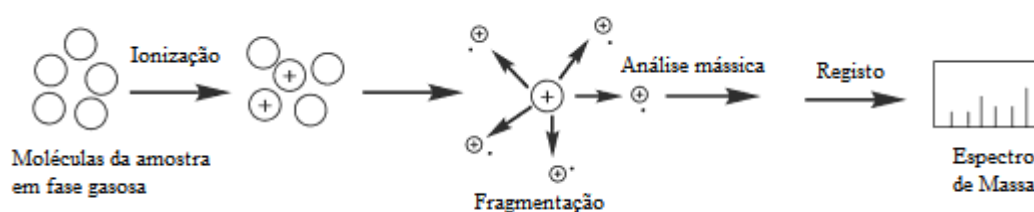


Figura 11 – Esquematisação do conceito de análise baseada em espectrometria de massa.

No espectómetro de massa as moléculas da amostra são ionizadas e o excesso de energia transferido durante a ionização pode fragmentar as moléculas em fragmentos característicos. Seguidamente efectua-se a separação e a análise dos iões moleculares e dos fragmentos carregados com base na razão entre massa e carga (m/z). Por fim a corrente de iões criada com essa separação é medida, amplificada e exibida sob a forma de um espectro de massa com a abundância relativa *versus* razão m/z [47, 50].

É fácil fazer uma combinação entre as técnicas de GC e MS, e por isso aparecem muitas vezes instrumentos analíticos GC-MS. A combinação destas duas técnicas proporciona um aumento exponencial da capacidade analítica do instrumento, e o GC-MS é a técnica mais versátil na identificação individual de componentes em misturas complexas de compostos orgânicos voláteis como são alguns grupos extractáveis, nomeadamente as famílias de compostos abordadas por este trabalho [47, 51].

Derivatização. Normalmente, a cromatografia em fase gasosa requer uma derivatização prévia dos compostos a analisar, como forma de aumentar a sua volatilidade até valores que permitam a sua análise por GC, esta necessidade é especialmente notória para compostos que tenham grupos polares, por exemplo OH e COOH.

Uma das formas de derivatização mais usadas é a formação de derivados trimetilsililados (TMS), particularmente adequada para os grupos de compostos em estudo [52]. A introdução de grupos trimetilsililo em grupos funcionais polares confere ainda estabilidade química e térmica aos compostos da amostra [53].

Capítulo 3 - Procedimentos experimentais

O objectivo deste trabalho foi estudar a extracção de compostos de elevado valor comercial da casca externa do *E. globulus*, nomeadamente ácidos triterpénicos, analisando para isso a dependência dos rendimentos da extracção com as condições de pressão, temperatura e percentagem de co-solvente. Mais concretamente, pretende-se tornar a extracção mais selectiva para esta família de compostos e ao mesmo tempo conseguir um rendimento tão elevado quanto possível.

Para tal seguiu-se o procedimento descrito a seguir, onde são apresentados os químicos e materiais que foram utilizados, o processo de recolha, preparação, e extracção da casca de eucalipto e a análise qualitativa e quantitativa dos extractos obtidos.

3.1 - Químicos e materiais

Neste trabalho utilizou-se etanol absoluto com pureza de 99.5% da Panreac (Barcelona,Espanha) como co-solvente nas extracções com dióxido de carbono supercrítico. O CO₂ utilizado foi fornecido pela Praxair (Danbury, E.U.A.) em garrafas com tubo de pesca. Para a recolha e transferência de amostras e limpeza do equipamento de extracção supercrítica foi usado diclorometano com pureza de 99.98% da Fisher Scientific (Leicestershire, Reino Unido). Na derivatização das amostras para análise em GC-MS foram utilizados trimetilclorossilano com pureza de 99% da Sigma Aldrich (Steinhein, Alemanha), trifluoracetamida com pureza de 98% da Acros Organics (New Jersey, E.U.A.) e piridina com pureza de 99.5% da Panreac (Barcelona,Espanha).

3. 2 - Recolha e preparação da casca para extracção

A recolha da casca de *Eucalyptus globulus* foi feita numa plantação de clones da Quinta de São Francisco em Eixo, Aveiro. A casca externa morta que se desprende a cada ciclo de crescimento foi colhida aleatoriamente, tanto das árvores como do solo. Após ser transportada para o laboratório, foi triturada num moinho de lâminas em partículas inferiores a 2 milímetros e deixada a secar ao ar até que o seu peso se manteve constante. Dado que após esta secagem ainda possuía alguma humidade, procedeu-se à sua quantificação recorrendo à secagem de uma amostra numa estufa a cerca de 100°C, até que a seu peso se manteve inalterado. Foi escolhida esta casca por ser a que revela uma maior abundância em compostos triterpénicos.

3. 3 - Extracção em Soxhlet

Foi realizada uma extracção em Soxhlet com diclorometano a uma amostra de casca com cerca de 27 g, durante seis horas. O extracto foi concentrado num evaporador rotativo, transferido para um porta amostras, seco, e derivatizado para posterior análise em GC-MS.

3. 4 - Extracção com CO₂ supercrítico

O equipamento utilizado nas extracções supercríticas efectuadas foi o Speed SFE, um modelo Helix SFE System da Applied Separations, Inc. .

Foram utilizadas amostras da casca externa de *Eucalyptus globulus* com cerca de 80 g de forma a preencher o vaso do extractor. As várias extracções foram conduzidas nas condições de pressão, temperatura e percentagem de co-solvente patentes na Tabela 3. O caudal de CO₂ foi controlado de forma a conseguir uma média de 6 g/min e o tempo total de extracção de cada amostra de casca foi 6 h (excepto na última extracção cujo tempo foi 8 h), sendo a recolha de extracto efectuada de hora a hora após as primeiras duas horas de extracção, com o objectivo de traçar as curvas de extracção.

Tabela 3 – Condições experimentais e tempo de extracção.

Extracção	Condições experimentais	Tempo
1	200 bar, 60°C e 5% etanol	6h
2	120 bar, 40°C e 5% etanol	6h
3	200 bar, 60°C e 0% etanol	6h
4	120 bar, 40°C e 0% etanol	6h
5	250 bar, 75°C e 5% etanol	8h

Como se pode observar no esquema da Figura 12, o dióxido de carbono líquido é bombeado com uma bomba refrigerada e depositado num vaso imediatamente antes da coluna de extracção, onde é aquecido e misturado com o co-solvente, caso esteja a ser utilizado. O dióxido de carbono pressurizado é posteriormente enviado para a coluna de extracção previamente carregada com a amostra. O leito está envolvido por uma manta de aquecimento e contém no seu interior um termopar ligado a um controlador, de forma a manter constante a temperatura de extracção. Após percolar a coluna, o solvente já com os compostos solubilizados é enviado para os vasos de recolha, onde é borbulhado em diclorometano arrefecido. Nesta fase ocorre uma queda de pressão que faz com que o CO₂ retome o estado gasoso e assim provocar a precipitação dos solutos no solvente colocado previamente nos vasos de recolha. Os vasos de recolha estão incorporados numa caixa arrefecida, e estão dispostos de forma a desempenhar o papel de uma armadilha, para que os solutos não sejam arrastados com o dióxido de carbono em estado gasoso para a linha de escape. Neste sistema existem uma válvula de segurança para cortar a alimentação de CO₂ ao sistema, uma válvula de escolha entre alimentação de co-solvente e limpeza da linha de recolha, válvulas que permitem escolher entre entrada pelo topo da coluna e saída pela cauda, ou vice-versa, e ainda uma válvula reguladora de caudal.

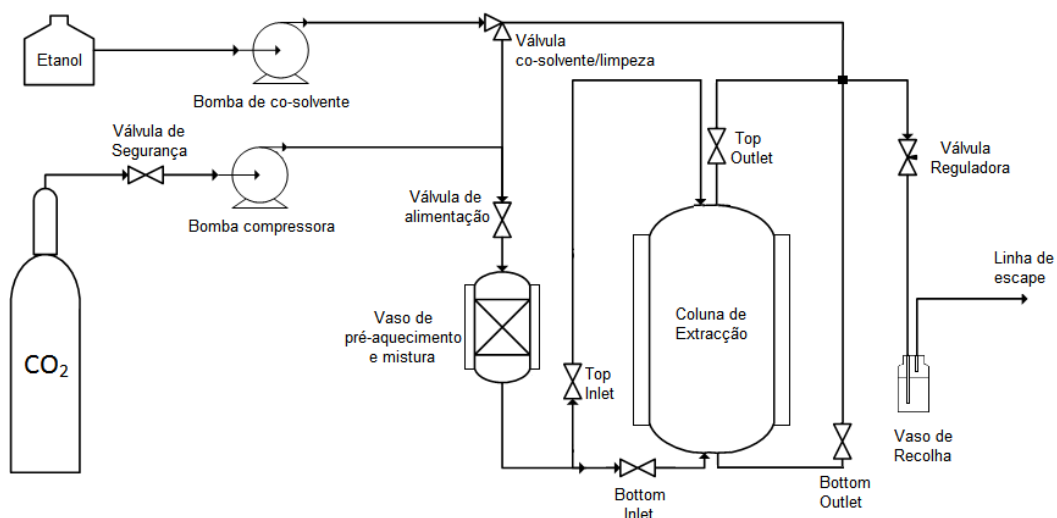


Figura 12 – Representação esquemática do equipamento de extracção supercrítica, utilizado neste trabalho.

Depois de recolhidos, os extractos foram concentrados num evaporador rotativo, transferidos para porta amostras e secos, de forma a eliminar qualquer acumulação de co-solvente, solvente de recolha ou de humidade. Seguidamente foram derivatizados para posterior análise em GC-MS.

3. 5 - Derivatizações e análise por GC-MS

A derivatização dos extractos recolhidos foi feita segundo um protocolo previamente descrito [6]. Foram utilizados cerca de 20 mg de cada extracto dissolvidos em 250 μL de piridina contendo 1 mg de tetracosano (padrão interno), que foram trimetilsililados por adição de 250 μL de trimetilclorossilano (TMSCl) e de 50 μL de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), como catalisador.

De seguida, cada mistura reaccional foi colocada em banho de óleo a 70 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min.

A análise de cada amostra foi efectuada por GC-MS, utilizando para o efeito um cromatógrafo Trace GC-200 Series acoplado com espectrómetro de massa DSQ II da Thermo Scientific. Cada amostra foi injectada em duplicado nas seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial de 80°C durante 5 minutos, aquecimento a uma taxa de 4°C/min até 260°C e por fim aquecimento a uma taxa de 2°C/min até 285°C, mantendo-se a essa temperatura por 10 minutos [6].

A identificação dos compostos foi feita através da comparação dos seus espectros de massa com bases espectrais (NIST Mass Spectral Database) e com dados da literatura [54-56].

A análise quantitativa foi feita com base na comparação da área dos picos cromatográficos dos compostos com a área do pico do padrão interno.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Neste trabalho teve-se como objectivo principal investigar as condições que maximizam a extracção de ácidos triterpénicos da casca do *Eucalyptus globulus* com dióxido de carbono no estado supercrítico. Para tal foram realizadas quatro extracções de seis horas onde foram aplicadas condições de temperatura, pressão e fracção de co-solvente diferentes (Tabela 3). É importante referir que este estudo tem de ser continuado num programa experimental mais extenso, de forma a ser conclusivo.

Outro objectivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade de conduzir a extracção em dois passos. Num primeiro passo seriam removidos, na sua maioria, os compostos de menor valor, como ácidos gordos, álcoois alifáticos de cadeia longa, esteróis e outros componentes não identificados. No segundo passo seria feita uma extracção sob condições diferentes, agora mais selectiva para os ácidos triterpénicos.

Neste capítulo descreve-se a identificação e quantificação por GC-MS dos compostos existentes nos extractos obtidos e discutem-se os rendimentos e as curvas cumulativas de extracção produzidas pelo acompanhamento da extracção supercrítica.

4. 1 - Rendimento global das extracções em Soxhlet e Supercrítico

Os rendimentos (m/m) obtidos para cada extracção diferem bastante (Tabela 4), sendo o mais elevado de 0.98% conseguido a 200 bar, 60°C com 5% de etanol. No entanto, é de referir que as extracções foram interrompidas ao fim de 6 h, sem que os compostos tivessem sido completamente removidos da casca, o que indica que o rendimento seria aumentado caso a extracção fosse prolongada.

O rendimento da extracção conduzida a 250 bar, 75°C e 5% etanol não pôde ser apresentado, uma vez que nas referidas condições surgem problemas associados ao entupimento da linha de recolha.

Tabela 4 – Rendimentos totais obtidos com cada conjunto de condições.

Condições experimentais	Rendimento % (m/m)
200 bar, 60°C e 5% etanol	0.98
120 bar, 40°C e 5% etanol	0.84
200 bar, 60°C e 0% etanol	0.64
120 bar, 40°C e 0% etanol	0.44
250 bar, 75°C e 5% etanol	Não quantificado
Soxhlet	1.60

Os extractos obtidos foram depois comparados quantitativamente e qualitativamente, e para isso foi necessário proceder-se à sua identificação e medição por GC-MS. Seguidamente são pormenorizados os aspectos mais relevantes que foram levados em consideração na detecção e identificação dos compostos de maior interesse neste trabalho.

4. 2 - Identificação por GC-MS dos ácidos triterpénicos

A identificação dos ácidos triterpénicos nos extractos obtidos com a aplicação da extracção supercrítica à casca de *E. globulus* e da extracção por Soxhlet foi feita com recurso a GC-MS. Foram analisados os cromatogramas e espectros de massa obtidos com esta técnica, os quais revelaram a existência de seis compostos desta família nos extractos, nomeadamente o ácido betulónico, o ácido oleanólico, o ácido betulínico, o ácido ursólico, o ácido 3-acetiloleanólico e o ácido 3-acetilursólico (Figura 7), cujas quantidades variam consoante as condições de extracção.

Na figura 13 é apresentado um cromatograma de GC-MS representativo dos extractos obtidos, os picos podem ser agrupados em três zonas, na zona 1 encontram-se essencialmente ácidos gordos e álcoois alifáticos de cadeia longa, na zona 2 estão presentes em maioria triterpenos e esteróis, sendo que na zona 3 se encontram exclusivamente os ácidos triterpénicos.

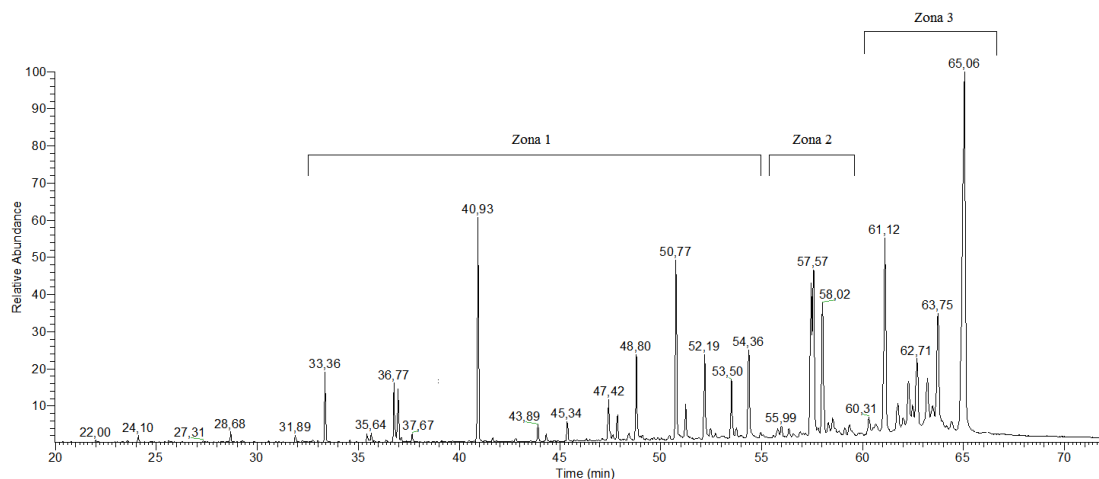


Figura 13 – Cromatograma do extracto derivatizado obtido da casca de *E. globulus* por extracção supercrítica (Condições: 200 bar, 60°C e 5% etanol).

A identificação dos picos cromatográficos foi levada a cabo por comparação dos tempos de retenção e dos respectivos espectros de massa dos derivados sililados com dados publicados e com padrões representativos dos compostos em estudo. A identificação dos vários compostos extraídos encontra-se na Tabela 5, com os respectivos tempos de retenção, e os espectros dos derivados TMS dos compostos mais importantes desta extracção estão representados nas Figuras 14, 15, 17 e 18.

Tabela 5 – Compostos extraídos e respectivos tempos de retenção e quantidades no extracto obtido.

Zonas	Tempo de Retenção (min)	Composto
Zona 1	28.68	Ácido tetradecanóico
	33.36	Ácido palmítico
	36.77	Ácido linoleico
	36.97	Ácido oleico
	37.67	Ácido octadecanóico
	41.65	Ácido eicosanóico
	43.89	1-Docosanol
	45.34	Acido Docosanóico
	47.42	1-Tetracosanol
	48.80	Ácido tetracosanóico
	49.09	1-Pentacosanol
	50.45	Ácido pentacosanóico
	50.77	1-Hexacosanol
	52.19	Ácido hexacosanóico
	52.48	1-Heptacosanol
	53.75	α -tocoferol
	54.36	1-Octacosanol
Zona 2	55.81	α -amiranona
	55.99	Ácido octacosanóico
	56.35	Estigmasterol
	57.46	β -amirina
	57.57	β -sitosterol
	58.02	α -amirina
Zona3	61.12	Ácido betulónico
	62.28	Ácido oleanólico
	62.71	Ácido betulínico
	63.23	Ácido ursólico
	63.75	Ácido 3-acetiloleanólico
	65.06	Ácido 3-acetilursólico

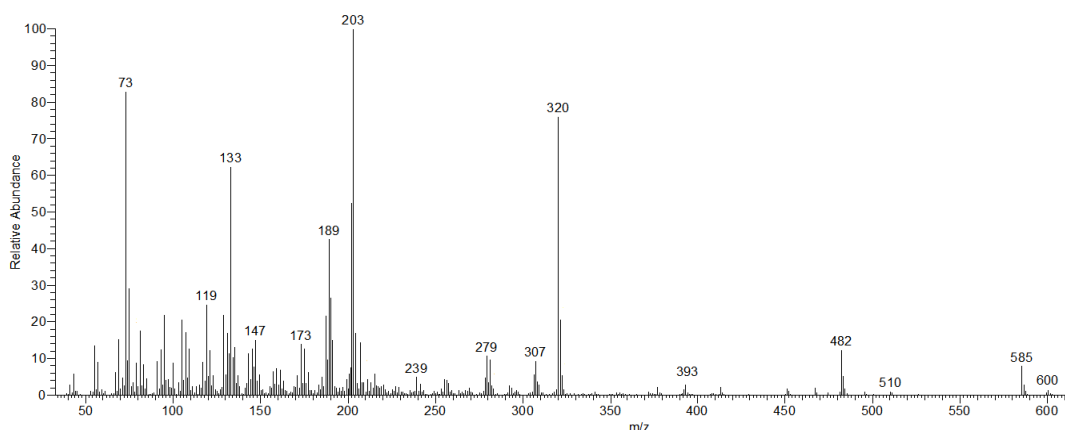


Figura 14 – Espectro de massa do derivado TMS do ácido ursólico.

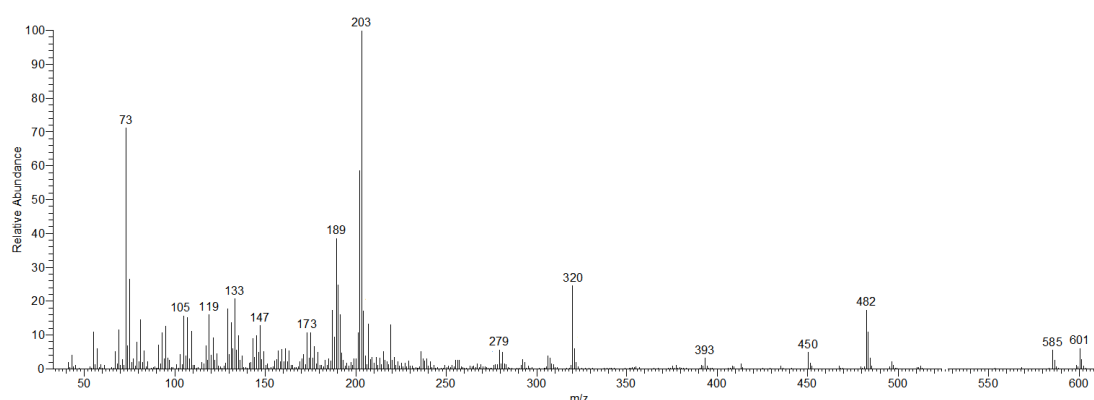


Figura 15 – Espectro de massa do derivado TMS do ácido oleanólico.

Os ácidos ursólico e oleanólico, cujos espectros de massa se mostram nas Figuras 14 e 15, são isómeros posicionais, com estruturas muito semelhantes (Figura 7). No entanto podem ser perfeitamente distinguidos pela ordem de eluição, sendo que o ácido ursólico fica retido durante mais tempo devido à conformação equatorial da sua estrutura que lhe confere maior planaridade do que a estrutura em conformação axial do ácido oleanólico [55, 57, 58]. Podem ainda ser distinguidos pela intensidade do sinal de fragmentação a m/z 320 nos espectros de massa. Esta intensidade é superior no caso do ácido ursólico, uma vez que corresponde à clivagem do anel C (Figura 16), que ocorre com maior facilidade na sua estrutura do que nas estruturas do tipo oleanano e lupano.

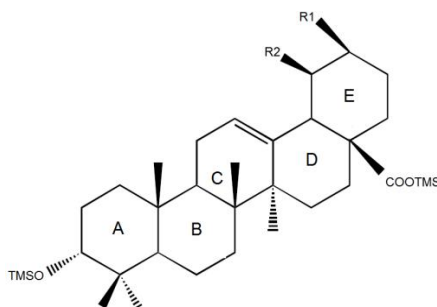


Figura 16 - Estrutura tipo ursano ($R_1=CH_3$ e $R_2=CH_3$) e tipo oleanano ($R_1=2CH_3$ e $R_2=H$).

Os principais fragmentos dos espectros de massa destes dois compostos encontram-se a m/z 600 (ião molecular), m/z 585 (perda do grupo metilo), m/z 482 (perda do grupo COOTMS) e m/z 393 (perda dos grupos COOTMS e TMSO). No entanto os sinais mais intensos encontram-se em m/z 320, 279, 203 e 133, e são característicos de clivagens que resultam em fragmentos que contêm os anéis A e B, e eventualmente parte do anel C [55, 58].

As formas acetiladas, na posição 3, destes dois ácidos triterpénicos diferenciam-se essencialmente pelo ião molecular surgir a m/z 570 em vez de 600 [58].

Os ácidos betulínico e betulónico são compostos do tipo lupano (Figura 7). Nos seus espectros de massa (Figuras 17 e 18), podem ser observados os fragmentos a m/z 189, 203 e 320, que correspondem à clivagem do anel C (Figura 19) [54-56]. A diferença entre ambos está no ião molecular para o ácido betulínico a m/z 600 e para o ácido betulónico a m/z 526, como resultado da presença de um grupo carbonilo no ácido betulónico, ao invés do grupo hidroxilo do ácido betulínico [54]. Outros fragmentos relevantes do ácido betulínico encontram-se a m/z 585 e 557, referentes às perdas dos grupos metilo e isopropilo, e a m/z 510 e 483, resultantes da perda dos grupos TMSO e COOTMS [54, 55, 59, 60].

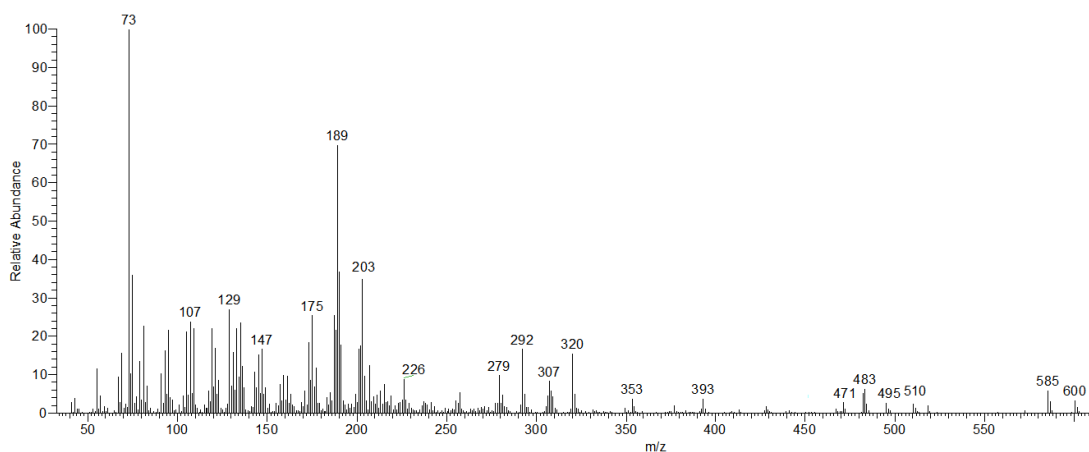


Figura 17 - Espectro de massa do derivado TMS do ácido betulínico.

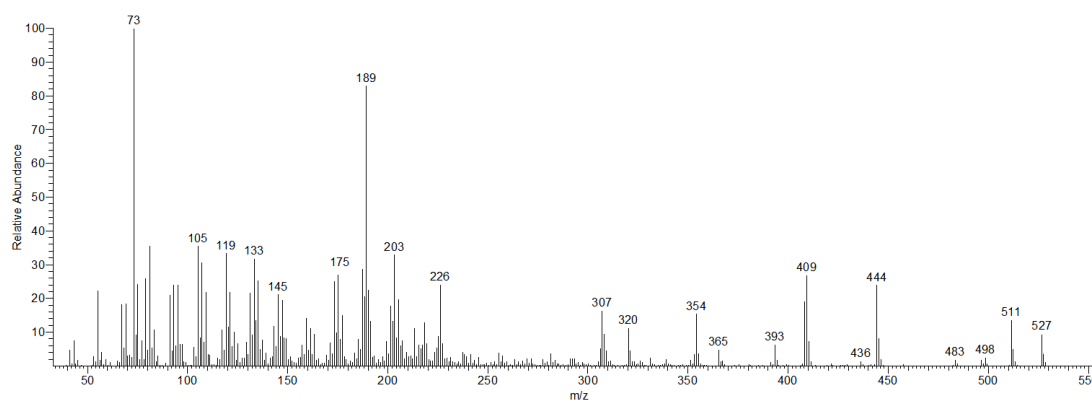


Figura 18 - Espectro de massa do derivado TMS do ácido betulínico.

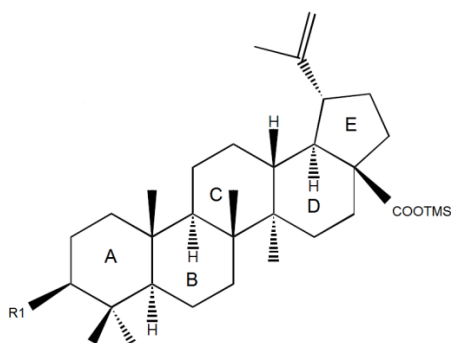


Figura 19 Estrutura do tipo ácido betulínico (R_1 =TMSO) e ácido betulónico (R_1 =O).

Além destes ácidos triterpénicos foram também identificados os triterpenos α -amiranona, α - e β -amirina, ácidos gordos, nomeadamente os ácidos palmítico, oleico e linoleico, bem como álcoois alifáticos de cadeia longa, como o octacosanol e hexacosanol, bem como o β -sitosterol e o estigmasterol.

4.3 - Quantificação dos compostos extraídos

Na Tabela 6 estão listados os compostos com a respectiva massa extraída, e percentagem para o extracto total obtido por extracção supercrítica a 200 bar, 60°C e com 5% de etanol e os valores referência obtidos por Soxhlet.

Tabela 6 – Compostos extraídos, respectivos tempos de retenção e quantidades obtidas.

Composto	200 bar, 60°C e 5% de etanol		Soxhlet	
	Rendimento (mg/kg de casca)	Percentagem no Extracto	Rendimento (mg/kg de asca)	Percentagem no Extracto
Ácido tetradecanóico	16.1	0.22	9.1	0.06
Ácido palmítico	86.9	1.20	62.6	0.39
Ácido linoleico	70.8	0.98	37.2	0.23
Ácido oleico	60.9	0.84	50.2	0.31
Ácido octadecanóico	13.2	0.18	7.1	0.04
Ácido eicosanóico	4.6	0.06	0.0	0.00
1-Docosanol	24.7	0.34	15.1	0.09
Ácido Docosanóico	31.0	0.43	12.0	0.07
1-Tetracosanol	72.5	1.00	51.0	0.32
Ácido tetracosanóico	127.2	1.76	70.6	0.44
1-Pentacosanol	5.0	0.07	0.0	0.00
Ácido pentacosanóico	7.3	0.10	0.0	0.00
1-Hexacosanol	257.0	3.56	273.7	1.71
Ácido hexacosanóico	140.1	1.94	70.1	0.44
1-Heptacosanol	16.5	0.23	16.9	0.11
α -tocoferol	18.5	0.26	38.2	0.24
1-Octacosanol	162.6	2.25	179.2	1.12
α -amiranona	16.9	0.23	11.6	0.07
Ácido octacosanóico	19.6	0.27	11.7	0.07
Estigmasterol	18.4	0.26	19.6	0.12
β -amirina	291.8	4.04	293.3	1.84
β -sitosterol	349.6	4.84	397.5	2.49
α -amirina	251.0	3.47	238.0	1.49
Ácido betulónico	472.7	6.54	543.6	3.40
Ácido oleanólico	377.8	5.23	660.1	4.13
Ácido betulínico	533.1	7.38	600.4	3.76
Ácido ursólico	524.7	7.26	1826.2	11.43
Ácido 3-acetiloleanólico	410.2	5.68	485.5	3.04
Ácido 3-acetilursólico	1473.6	20.40	1393.0	8.72
TOTAL	5854.5	81.0	7373.5	46.2

Os ácidos triterpénicos são a família de compostos presentes em maior abundância nos extracto obtido nas referidas condições de extracção supercrítica, perfazendo um total de 3949 mg/kg de casca, o que corresponde a cerca de metade do total extraído, como também se constata no extracto obtido por Soxhlet, cuja quantidade foi de 5508.8 mg/kg de casca, correspondentes a 34.5% do extracto.

Dentro da fracção referente aos ácidos triterpénicos extraídos por extracção supercrítica encontra-se maioritariamente o ácido 3-acetilursólico, que pode ser hidrolisado para formar ácido ursólico e assim potenciar a quantidade obtida deste ácido para 1998.3 mg/kg de casca, correspondente a aproximadamente 28% do extracto obtido e a metade dos ácidos triterpénicos extraídos. Isto não é observado na extracção por Soxhlet, uma vez que, por esta via, o ácido ursólico é encontrado em quantidades superiores ao seu derivado acetilado, o que se explica pelo facto da extracção supercrítica ser mais selectiva para compostos mais apolares. Se fosse feita uma hidrólise a este extracto, a quantidade final de ácido ursólico ascenderia a 3219.2 mg/kg de casca.

Os restantes ácidos triterpénicos foram extraídos em quantidades mais pequenas e muito semelhantes, tanto por extracção supercrítica como por Soxhlet.

Quanto aos compostos de menor valor, foram detectadas quantidades significativas de esteróis, sendo o β -sitosterol o mais representativo, e de triterpenóides, principalmente α - e β -amirina. Outros compostos indesejáveis encontrados com menos expressão foram os álcoois alifáticos de cadeia longa e ácidos gordos, onde se destacam os álcoois 1-hexacosanol e 1-octacosanol, e os ácidos palmítico, tetracosanóico e hexacosanóico. É de notar que com o recurso à extracção supercrítica foi extraída uma quantidade de compostos indesejados substancialmente inferior à que se obteve por Soxhlet, como já se tinha inferido pelas percentagens referidas de ácidos triterpénicos nos extractos.

4. 4 - Extracção supercrítica de ácidos triterpénicos

Nesta secção será analisado o comportamento das diferentes famílias de compostos do extracto lipofílico da casca externa do *Eucalyptus globulus* durante a extracção supercrítica, em diferentes condições experimentais.

4. 4. 1 - Comportamento da extracção ao longo do tempo

Nas experiências realizadas, a partir das duas horas de extracção foram recolhidos os extractos de hora a hora, no sentido se de averiguar a variação a taxa de extracção ao longo das seis horas e traçar as respectivas curvas cumulativas. Na Tabela 7 são apresentados as quantidades de extracto e de ácidos triterpénicos obtidos para cada conjunto de condições experimentais e para cada interrupção da extracção.

Tabela 7 – Pontos experimentais da curva de extracção.

Tempo (h)	Extracto total (mg/kg de casca externa)				Ácidos triterpénicos (mg/kg de casca externa)			
	200bar 60°C	120bar 40°C	120bar 40°C	200bar 60°C	200bar 60°C	120bar 40°C	120bar 40°C	200bar 60°C
	0% etanol	0% etanol	5% etanol	5% etanol	0% etanol	0% etanol	5% etanol	5% etanol
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3573	2418	4628	5999	691	301	2031	2218
3	4713	3090	6395	8137	1006	478	2785	3213
4	5438	3711	7326	8852	1223	641	3200	3535
5	6006	4109	7861	9321	1425	781	3396	3773
6	6433	4399	8339	9669	1604	890	3608	3949

Como se pode observar na Tabela 7, o valor máximo de extracto foi obtido a 200 bar, 60°C e com 5% de etanol, e foi de 9669 mg/kg de casca, que corresponde a cerca de 60% do que se consegue extrair em Soxhlet. Já valor máximo de ácidos triterpénicos foi obtido nas mesmas condições, e foi de 3949 mg/kg de casca seca. É um valor ainda inferior ao conseguido pela extracção em Soxhlet (cerca de 72%), que é cerca de 5509 mg/kg de casca.

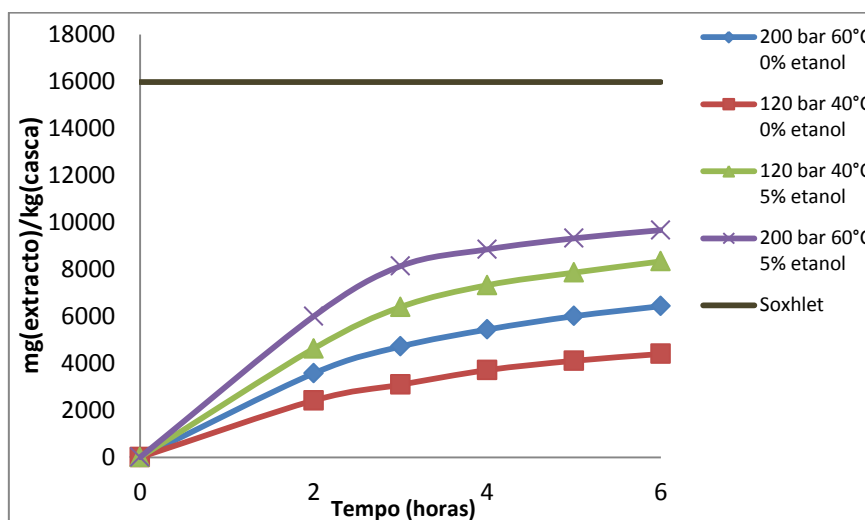


Figura 20 – Curvas cumulativas de extração da casca externa morta do *Eucalyptus globulus*.

Analisando a Figura 20, constata-se que a taxa de remoção varia consoante o tempo de extração. Nas extrações onde se obteve maior rendimento essa taxa é bastante elevada nas primeiras três horas, reduzindo-se bastante no restante tempo de extração. Isto explica-se pelo facto de a concentração de solutos na fase sólida diminuir ao longo do tempo, o que faz baixar a força directriz, que é diferença de concentrações entre a interface sólido-fluido e o CO₂ supercrítico, e consequentemente diminuir a transferência de massa.

Na Figura 20 observa-se ainda que se introduz uma melhoria na extração quando a temperatura e pressão são aumentadas, no entanto o grande ganho é produzido quando se adiciona o co-solvente, que neste caso é o etanol. Os ganhos conseguidos com a adição de co-solvente foram cerca de 2.7 g a 120 bar e 40°C e cerca de 2.3 g a 200 bar e 60°C, isto por kg de casca (ver Tabela 7). No entanto a quantidade total de extracto obtido nestas condições é ainda muito inferior ao alcançado por Soxhlet, sendo que com a adição de co-solvente a 120 bar e 40°C apenas foram conseguidas cerca de 8.3 g/kg e a 200 bar e 60°C cerca de 9.6 g/kg, enquanto por Soxhlet foram conseguidas perto de 16 g/kg.

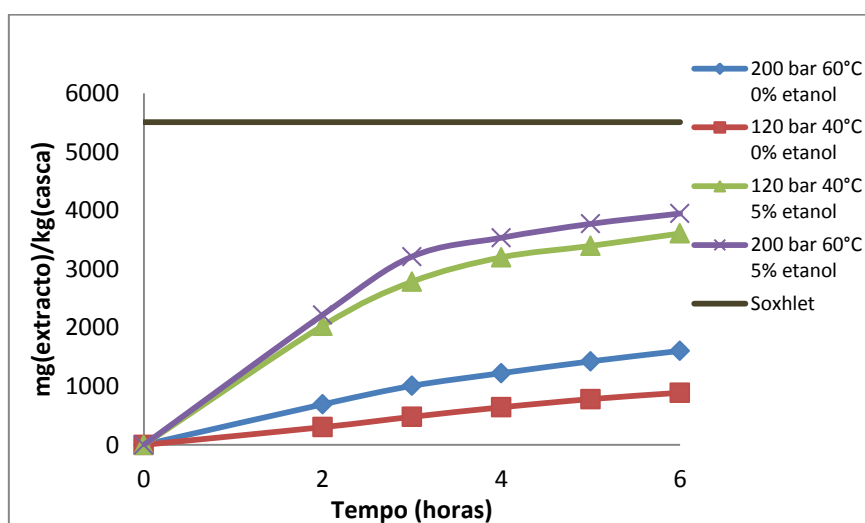


Figura 21 – Curvas cumulativas de extração dos ácidos triterpénicos presentes na casca externa morta do *Eucalyptus globulus*: ácidos betulínico, betulónico, ursólico, oleanólico, 3-acetilursólico e 3-acetiloleanólico.

Na Figura 21, verifica-se que a adição do co-solvente é o factor determinante no rendimento em ácido triterpénicos, além disso, constata-se que quando se utiliza co-solvente a variação da pressão e temperatura não têm impactes significativos sobre o rendimento, o que pode trazer mais-valias a nível industrial em termos de economia energética, uma vez que se pode conduzir a extracção sob condições menos exigentes, afectando pouco o rendimento.

No sentido de interpretar a melhoria introduzida com a adição de etanol, foram feitos cálculos de densidade e viscosidade da mistura solvente por interpolação de dados da literatura [61-63]. Verificou-se que a adição de 5% (m/m) de etanol não implicou alterações significativas na densidade e viscosidade do dióxido de carbono que justificassem tais ganhos. A explicação reside no facto de o etanol actuar como modificador polar quando misturado com o dióxido de carbono, já que os compostos polares apresentam baixa solubilidade no dióxido de carbono supercrítico, devido à natureza lipofílica deste solvente [26, 45, 64]. Ora os ácidos triterpénicos exibem uma ligeira polaridade devida à presença dos grupos hidroxilo e carboxilo, polaridade essa que é atenuada no caso dos seus derivados acetilados, pela substituição de grupos hidroxilo por grupos acetilo (Figura 7). Assim, os ácidos triterpénicos não acetilados, como apresentam uma maior polaridade do que os seus derivados acetilados, foram recuperados em maior quantidade nas extracções onde se introduziu o etanol como

co-solvente (Figura 21), o que melhorou o rendimento da extracção em ácidos triterpénicos (Tabela 7). No entanto é necessário tomar algum cuidado com a fracção de co-solvente adicionada ao dióxido de carbono supercrítico, uma vez que ao aumentar em demasia a polaridade do solvente pode-se baixar a selectividade, extraindo compostos não desejados.

Quanto ao melhoramento introduzido pelo aumento de pressão e temperatura, este explica-se pela forma como o incremento de temperatura aumenta o poder solvente dos fluidos. Em primeiro lugar eleva a pressão de vapor do soluto, e, por outro lado, favorece a penetração do fluido no interior da partícula [65, 66].

O rendimento da extracção é um aspecto relevante neste trabalho, no entanto a selectividade da extracção para os ácidos triterpénicos é um factor mais importante, e nesse sentido a extracção supercrítica mostras-te mais eficaz do que o Soxhlet, uma vez que apresenta um menor teor em compostos de menor valor, como se pode verificar na Figura 22. A extracção supercrítica mostra assim uma melhoria na quantidade de ácidos triterpénicos no extracto, embora se afecte negativamente o rendimento em 1560 mg de ácidos triterpénicos/kg de casca seca, o que se pode traduzir em ganhos ao nível de processos de separação e purificação dos compostos desejados. A pureza conseguida em ácidos triterpénicos com a extracção supercrítica a 200 bar, 60°C e com 5% de etanol foi de 69%, muito superior à obtida por Soxhlet que foi de 53%.

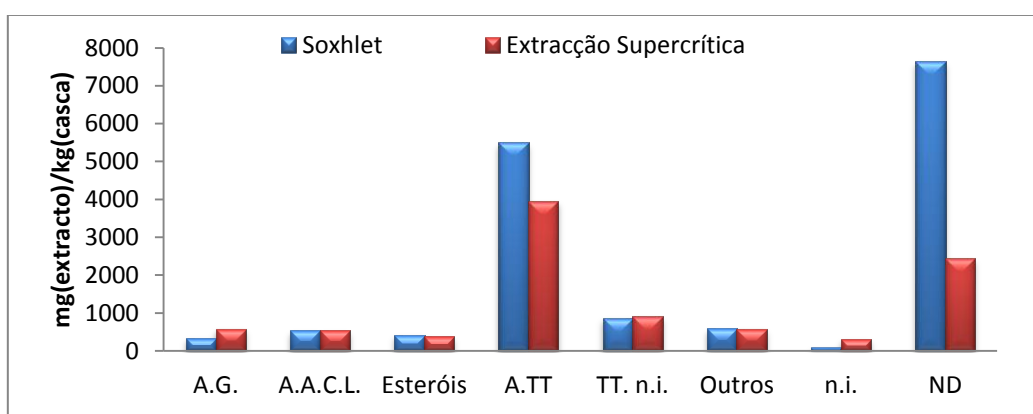


Figura 22 - Quantidade dos tipos de extractáveis obtidos da casca de *E. globulus* por extracção supercrítica (Condições: 200 bar, 60°C e 5%etanol) e por Soxhlet. (A.G. – Ácidos Gordos, A.A.C.L – Álcoois Alifáticos de Cadeia Longa, A.TT – Ácidos triterpénicos, TT.n.i – Triterpenoides não identificados, n.i. – não identificados, ND – não detectados).

4.4.2 - Comportamento da extracção de ácidos triterpénicos ao longo do tempo

Como foi referido anteriormente, um dos objectivos deste trabalho é avaliar a possibilidade de conduzir a extracção em dois passos. Para isso é necessário estudar o comportamento da extracção em termos de ácidos triterpénicos, pois das curvas cumulativas que englobam a totalidade de compostos extraídos e a totalidade de ácidos triterpénicos não é possível retirar conclusões nesse sentido. Por isso foram analisados com maior detalhe os comportamentos de cada ácido triterpénico e de cada família em que se englobam, ou seja, acetilados e não acetilados. Nas Figuras 23 e 24 são apresentadas as curvas de extracção cumulativas das duas famílias de ácidos triterpénicos, construída a partir dos dados da Tabela 8.

Tabela 8 – Quantidades extraídas (em mg/kg de casca) de ácidos triterpénicos acetilados e não acetilados, obtidos ao longo do tempo de extracção, para as quatro condições experimentais deste trabalho.

Tempo (h)	200bar, 60°C e 0% etanol		120bar, 40°C e 0% etanol		120bar, 40°C e 5% etanol		200bar, 60°C e 5% etanol	
	Não acetilados	Acetilados	Não acetilados	Acetilados	Não acetilados	Acetilados	Não acetilados	Acetilados
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	208	483	96	205	562	1035	877	1341
3	301	695	163	315	904	1402	1470	1743
4	375	838	219	422	1091	1604	1713	1822
5	447	968	264	517	1264	1619	1908	1865
6	515	1080	299	590	1433	1658	2065	1884

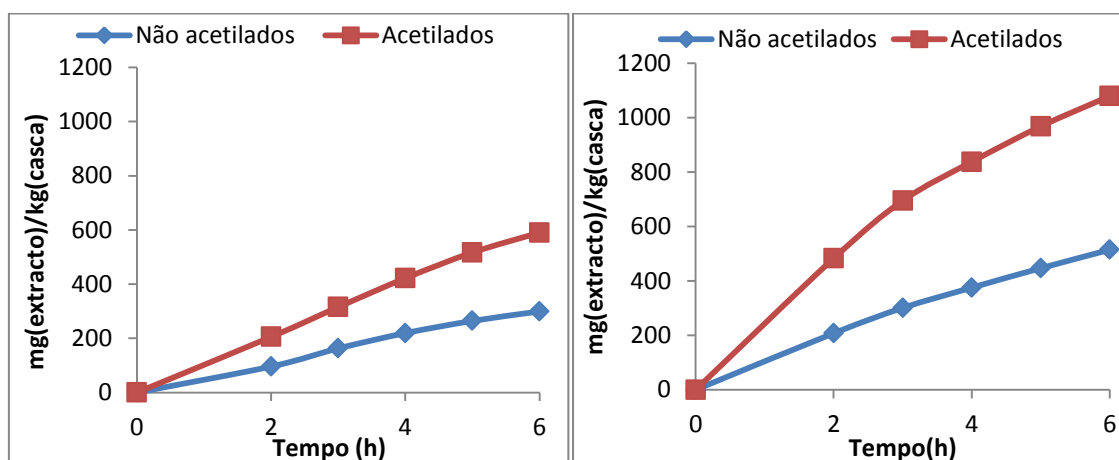


Figura 23 - Curvas de extracção de ácidos Triterpénicos acetilados e não acetilados. Condições: 200 bar 60°C, 0% etanol (à direita) e 120bar, 40°C, 0% etanol (à esquerda).

Da Figura 23 observa-se que todas as curvas de extracção não tendem para um patamar, o que significa que a extracção de ácidos triterpénicos não ficou concluída, o que pode ser interessante na medida em que estas condições podem ser favoráveis ao primeiro passo da extracção, com o intuito de remover a maior quantidade de compostos indesejáveis, sem que isso afecte em demasia a extracção de ácidos triterpénicos no segundo passo.

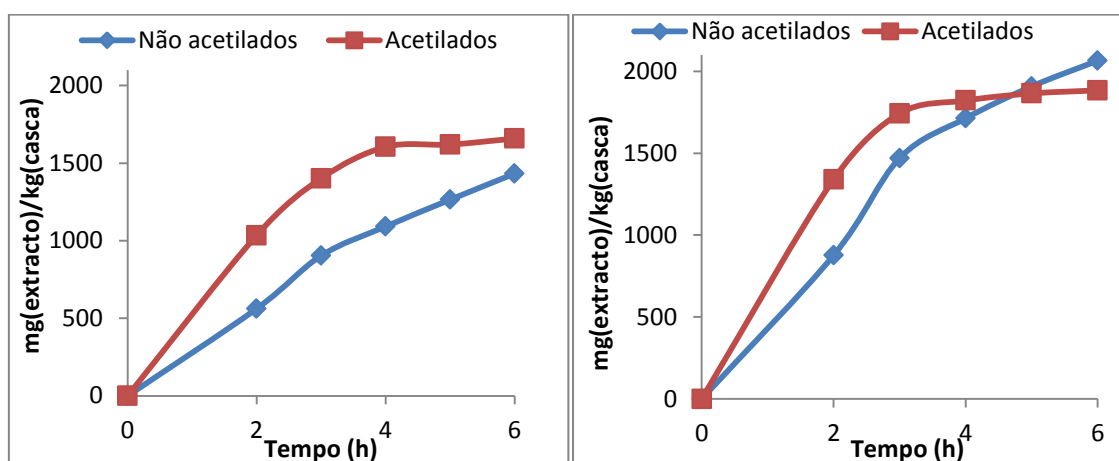


Figura 24 - Curvas de extracção de ácidos Triterpénicos acetilados e não acetilados. Condições: 200 bar, 60°C, 5% etanol (à direita) e 120 bar, 40°C, 5% etanol (à esquerda).

Contrariamente às extracções onde não foi utilizado co-solvente, as curvas da Figura 24 e os dados da Tabela 8 mostram que a quantidade de ácidos triterpénicos acetilados se mantém praticamente inalterada a partir da terceira ou quarta hora de extracção, o que indica que nas condições referidas a extracção destes compostos acetilados atinge um valor máximo mais rapidamente. Por exemplo, isto não acontece com os compostos não acetilados, pois, como se verifica nas curvas da Figura 24, a quantidade de não acetilados extraída varia quase que linearmente com o tempo, e, embora a sua extracção ocorra a uma velocidade inferior, ao fim das seis horas quase que atinge a mesma quantidade dos acetilados, nas condições de 120 bar, 40°C e 5% etanol (Figura 24, à esquerda), chegando mesmo a ultrapassar essa quantidade nas condições de 200 bar, 60°C e 5% etanol (Figura 24, à direita). Uma vez mais se constata que o tempo de extracção não foi suficiente para recolher a quantidade máxima de ácidos triterpénicos. Face a isto, foi decidido efectuar uma extracção adicional sob

condições mais severas, 250 bar, 75°C e 5% etanol e durante 8 h. No entanto estas condições revelaram-se problemáticas para o normal funcionamento do equipamento, dada a elevada queda de pressão no vaso de recolha, tendo surgido entupimentos, fugas de solvente dos recipientes de recolha e dificuldades no controlo do caudal de CO₂. Por este motivo não foi possível apresentar dados conclusivos a partir desta experiência, devido às perdas de extracto ocorridas.

Ao comparar os valores obtidos com a extracção supercrítica a 200 bar, 60°C com adição de 5% de etanol, com os valores do Soxhlet, verificou-se que os ácidos acetilados foram removidos do substrato quase na sua totalidade, uma vez que o ácido 3-acetilursólico foi completamente removido, e o ácido 3-acetiloleanólico foi removido até cerca de 85% da sua totalidade. Já a extracção de não acetilados por extracção supercrítica ficou muito aquém da extracção em Soxhlet, com o CO₂ a remover cerca de 57% dos ácidos não acetilados do substrato. Isto explica-se mais uma vez com base na polaridade dos solutos extraídos, uma vez que os solutos acetilados são mais apolares e por isso mais solúveis em CO₂ supercrítico.

É igualmente importante analisar a extracção de cada ácido triterpénico ao longo do tempo, por isso foram representadas as curvas de extracção cumulativas para cada um deles nas Figuras 25 e 26, a partir dos dados da Tabela 9. Estas curvas estão representadas para as condições de 200 bar e 60°C e 5% etanol como co-solvente, e diferem apenas no facto de a Figura 26 estar normalizada pelos valores obtidos por Soxhlet.

Tabela 9 - Extracto de cada ácido triterpénico obtido ao longo do tempo, a 200bar 60°C e 5% etanol.

Tempo (h)	Ácido Betulónico	Ácido Oleanólico	Ácido Betulínico	Ácido Ursólico	Ácido 3-acetiloleanólico	Ácido 3-acetilursólico
0	0	0	0	0	0	0
2	387	133	182	176	305	1036
3	556	242	361	311	378	1365
4	595	295	436	387	394	1428
5	618	340	492	458	405	1460
6	629	378	533	525	410	1474

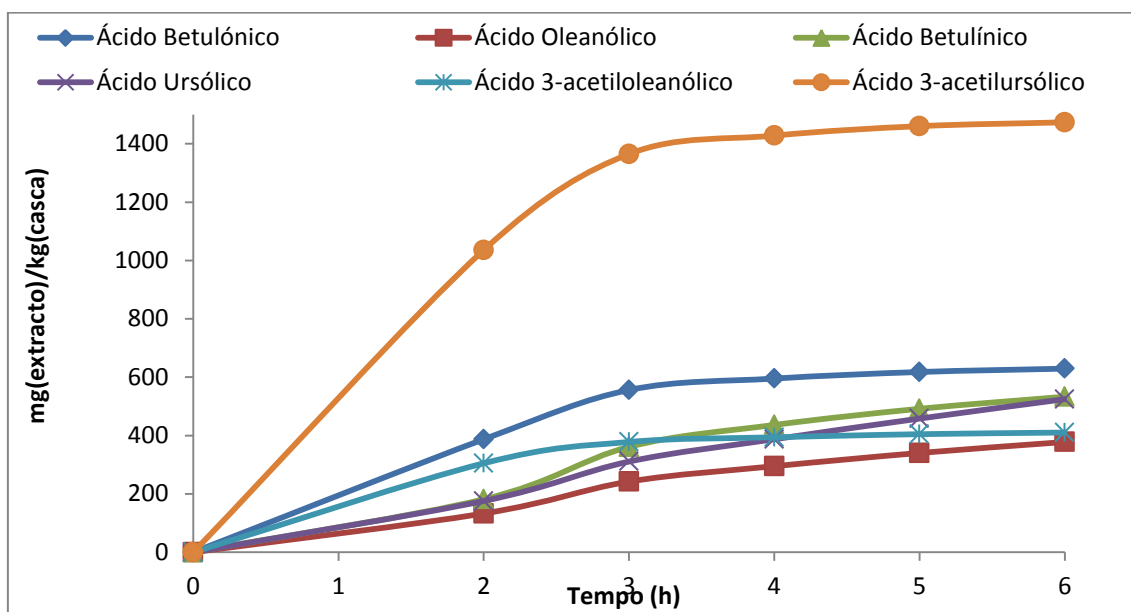


Figura 25 - Curvas de extracção para cada ácido triterpénico a 200bar 60°C e 5% etanol.

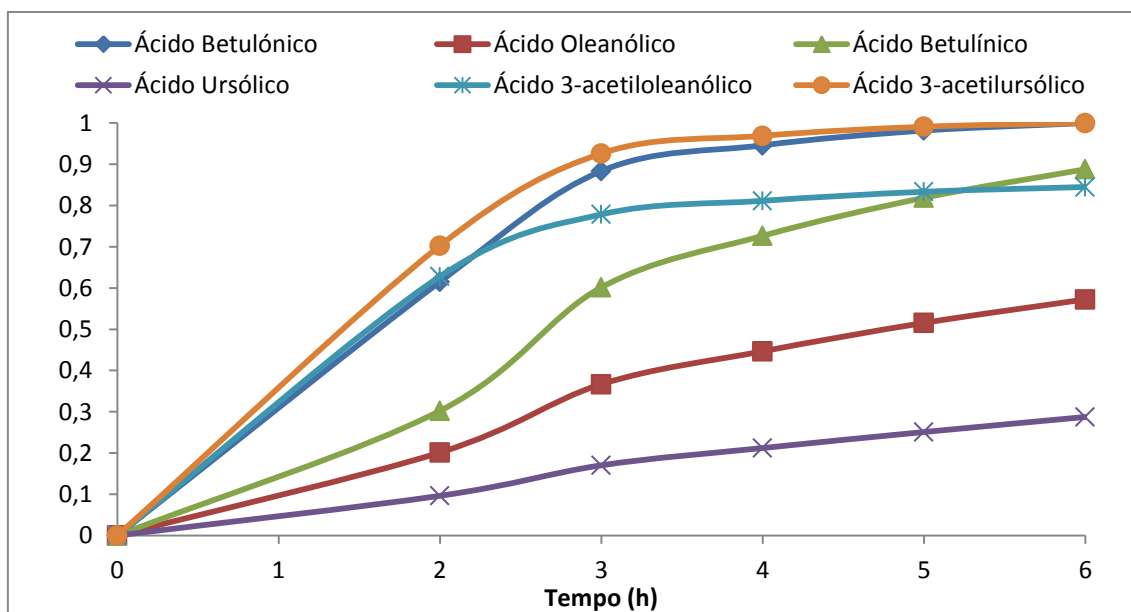


Figura 26 - Curvas de extracção para cada ácido triterpénico a 200 bar 60°C e 5% etanol, normalizadas pelos valores obtidos por Soxhlet.

Na Figura 25 destaca-se a curva de extracção do ácido 3-acetilursólico que, como já se tinha verificado, é para o qual a extracção supercrítica é mais selectiva. No entanto, a quantidade máxima ronda as 1400 mg/kg de casca (ver Tabela 9), que é atingida entre as 3 e as 4h. Olhando também para a Figura 26 percebe-se que esta é a quantidade máxima deste ácido existente no sólido. Este facto pode ser relevante na

medida em que a extracção pode ser parada às 4h e as condições de operação alteradas de forma a favorecer a extracção dos outros ácidos desejados. O mesmo se poderá concluir para o caso do ácido betulónico, dado que apresenta o mesmo comportamento que o ácido 3-acetilursólico.

A quantidade de ácido 3-acetiloleanólico também atinge um patamar entre as 3 e as 4 horas, no entanto as cerca de 400 mg/kg de casca (ver Tabela 8) ficam muito aquém da quantidade obtida por Soxhlet, o que indica que estas condições não permitem extrair este ácido na sua totalidade. Quanto aos outros ácidos triterpénicos, a sua quantidade extraída quando comparada com os valores obtidos por Soxhlet revela a certeza de que a sua extracção não foi completa. As curvas de extracção não atingem um patamar de rendimento, apresentando uma relação com o tempo quase linear.

Estas condições revelam ser pouco adequadas à extracção dos ácidos ursólico e oleanólico, cujas quantidades máximas extraídas foram de 29 e 57% dos valores obtidos por Soxhlet, respectivamente. No entanto, o ácido betulónico apesar de não ser totalmente removido durante o tempo de extracção, prevê-se que o possa ser no caso do tempo de extracção ser prolongado, uma vez que a sua quantidade foi de 89% em relação ao Soxhlet.

A análise global destes dados específicos para cada ácido permite retirar a conclusão de que a extracção de ácidos triterpénicos não pode ser apenas analisada através do agrupamento destes numa família, é importante que se estude cada um isoladamente, porque mesmo sendo compostos muito semelhantes, revelam diferenças que afectam determinantemente a sua solubilidade.

Capítulo 5 - Conclusões e sugestões de trabalho futuro

Conclusões.

Este trabalho visou estudar a extracção supercrítica de compostos de valor acrescentado da casca de *Eucalyptus globulus*, mais especificamente ácidos triterpénicos como o ursólico, oleanólico, betulínico, betulónico e os derivados acetilados dos três primeiros, de forma a analisar a influência que as condições operatórias têm sobre o rendimento e selectividade das extracções.

As condições de extracção avaliadas foram a temperatura, a pressão e a percentagem de co-solvente (etanol) adicionado ao dióxido de carbono supercrítico, tendo sido realizadas experiências para cinco condições distintas: 200 bar, 60°C, sem etanol; 120 bar, 40°C, sem etanol; 200 bar, 60°C, com 5% de etanol; 120 bar e 40°C, com 5% etanol; 250 bar, 75°C, com 5% de etanol. Os extractos obtidos foram analisados qualitativa e quantitativamente por GC-MS, de forma a calcular os rendimentos e as curvas de extracção que caracterizam cada conjunto de condições adoptado.

Os resultados obtidos permitiram confirmar que o rendimento (m/m) depende da pressão e temperatura da extracção, mas principalmente da introdução de co-solvente, chegando mesmo a duplicar o seu valor: o rendimento passa de 0.44% para 0.84% quando, a 120 bar e 40°C, se adiciona 5% de etanol ao CO₂ supercrítico. O rendimento mais elevado foi 0.98%, conseguido a 200 bar, 60°C com 5% de etanol, condições em que se obteve também a maior quantidade de ácidos triterpénicos: 3.9 g/kg de casca, correspondente cerca de metade do extracto total obtido. Por outro lado, quando a extracção foi feita na ausência de co-solvente, o teor de ácidos triterpénicos no extracto é da ordem de 1,6g/kg e 17% respectivamente

No que se refere á composição em ácidos triterpénicos dos extractos, quando estes são obtidos sem co-solvente, são extraídos maioritariamente derivados acetilados, sendo os derivados não acetilados são extraídos em quantidades pouco expressivas.

Quando o etanol é usado como modificador do CO₂, torna-o capaz de extrair em maior quantidade os ácidos não acetilados, proporcionando maiores rendimentos. Por

exemplo, ao comparar os rendimentos da extracção Soxhlet com os valores obtidos por extracção supercrítica a 200 bar, 60°C e 5% de etanol verificou-se que os ácidos acetilados foram removidos do substrato quase totalmente. Embora o rendimento de extracção dos derivados não acetilados aumente consideravelmente, verifica-se que comparativamente com a extracção Soxhlet, apenas 57% dos ácidos não acetilados presentes na amostra foram extraídos nestas condições.

A análise dos extractos por GC-MS permitiu concluir que os ácidos triterpénicos são a família de compostos presentes em maior abundância nos extractos. Dentro desta fracção encontra-se maioritariamente o ácido 3-acetilursólico, que pode ser hidrolisado para regenerar ácido ursólico e assim potenciar a quantidade obtida deste ácido para cerca de um terço do extracto, e aproximadamente metade dos ácidos triterpénicos removidos. Nas condições onde se obteve melhor rendimento (200 bar, 60°C, 5% de etanol) o ácido 3-acetilursólico foi totalmente extraído (aproximadamente 1.4 g/kg de casca), tal como o ácido betulónico (cerca de 0.6 g/kg de casca).

Através da análise das curvas cumulativas de extracção constatou-se que a taxa de extracção varia com o tempo, sendo constante nas primeiras três horas, reduzindo-se bastante com a continuação da extracção.

Em relação à selectividade da extracção com dióxido de carbono supercrítico, concluiu-se que com este processo se conseguem extractos enriquecidos em ácidos triterpénicos, o que facilita a posterior separação e purificação de cada ácido desta família por outras técnicas mais finas, como as baseadas em princípios cromatográficos.

Com base nos resultados obtidos as melhores condições para extrair de forma selectiva uma fracção enriquecida em ácidos triterpénicos passariam por conduzir extracções supercríticas em dois passos, num primeiro passo utilizando condições de pressão e temperatura baixas e sem adição de co-solvente, de forma a remover de forma preferencial os compostos de menor valor. Num segundo passo a extracção pode ser conduzida já em pressões e temperaturas elevadas, mas sempre com a adição de etanol, de forma a tornar a extracção selectiva para os compostos desejados.

Sugestões de trabalho futuro.

Esta dissertação deu um contributo para o estudo da extracção supercrítica de ácidos triterpénicos da casca de eucalipto com dióxido de carbono modificado ou não com etanol. Como era expectável, ficou em aberto um conjunto de experiências que seria importante realizar.

De forma a melhorar as condições estudadas, e a comprovar o modelo de extracção proposto, a continuação deste trabalho deveria envolver a realização extracções para mais condições diferentes de pressão e temperatura, no sentido de se encontrar condições que maximizem o rendimento de extracção em ácidos triterpénicos. É necessário analisar o impacto do tempo de extracção, pois os resultados apresentados nesta tese mostram que as corridas de 6 h são insuficientes para alguns compostos. Em todos os casos é fulcral que a análise dos extractos seja feita individualmente para cada ácido, pois este facto revelou-se essencial no trabalho aqui relatado. De facto, uma extracção pode ser globalmente incompleta para uma dada família, e, em simultâneo alguns composto-alvo terem já sido totalmente extraídos.

Referências

- [1]Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., and Parajó, J.C.,2006. *Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **54**(7): p. 2441-2469.
- [2]Pan, X., Niu, G., and Liu, H.,2003. *Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves*. Chemical Engineering and Processing, **42**(2): p. 129-133.
- [3]Vinatoru, M.,2001. *An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs*. Ultrasonics Sonochemistry, **8**(3): p. 303-313.
- [4]Azevedo, E.,2005. *Tecnologia Supercrítica: Passado, Presente, Futuro*. Boletim da SPQ: p. 36-39.
- [5]Domingues, R.M.A., Sousa, G.D.A., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., and Neto, C.P.,2010. *Eucalyptus globulus biomass residues from pulping industry as a source of high value triterpenic compounds*. Industrial Crops and Products, **31**(1): p. 65-70.
- [6]Domingues, R.M.A., Sousa, G.D.A., Silva, C.M., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., and Neto, C.P.,2011. *High value triterpenic compounds from the outer barks of several Eucalyptus species cultivated in Brazil and in Portugal*. Industrial Crops and Products, **33**(1): p. 158-164.
- [7]Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Neto, C.P., and Cavaleiro, J.A.S.,2002. *Lipophilic Extractives of the Inner and Outer Barks of Eucalyptus globulus*. Holzforschung, **56**(4): p. 372-379.
- [8]Group, L.C.S. 2001; Available from: <http://www.chem.leeds.ac.uk/People/CMR/nav.html>.
- [9]Brunner, G.,2005. *Supercritical fluids: technology and application to food processing*. Journal of Food Engineering, **67**(1-2): p. 21-33.
- [10]Generalic, E. "*Supercritical fluid.*", *Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary*. 2010; Available from: <http://glossary.periodni.com/dictionary.php?en=supercritical%2520fluid>.
- [11]Daintree, L.S., Kordikowski, A., and York, P.,2008. *Separation processes for organic molecules using SCF Technologies*. Advanced Drug Delivery Reviews, **60**(3): p. 351-372.
- [12]Marr, R. and Gamse, T.,2000. *Use of supercritical fluids for different processes including new developments--a review*. Chemical Engineering and Processing, **39**(1): p. 19-28.
- [13]Reverchon, E. and De Marco, I.,2006. *Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter*. The Journal of Supercritical Fluids, **38**(2): p. 146-166.
- [14]Cocero, M. and Calvo, L.,1996. *Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO₂-ethanol mixtures*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **73**(11): p. 1573-1578.
- [15]Dobbs, J.M., Wong, J.M., Lahiere, R.J., and Johnston, K.P.,1987. *Modification of supercritical fluid phase behavior using polar cosolvents*. Industrial & Engineering Chemistry Research, **26**(1): p. 56-65.
- [16]Dunford, N. and Temelli, F.,1995. *Extraction of phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **72**(9): p. 1009-1015.
- [17]Molero Gómez, A., Pereyra López, C., and Martinez de la Ossa, E.,1996. *Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction*. The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal, **61**(3): p. 227-231.
- [18]Passos, C.P., Silva, R.M., Da Silva, F.A., Coimbra, M.A., and Silva, C.M.,2009. *Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed*. The Journal of Supercritical Fluids, **48**(3): p. 225-229.

- [19]Demirbas, A.,2008. *Oils from hazelnut shell and hazelnut kernel husk for biodiesel production*. Energy Sources Part a-Recovery Utilization and Environmental Effects, **30**(20): p. 1870-1875.
- [20]Gouveia, L., Nobre, B.P., Marcelo, F.M., Mrejen, S., Cardoso, M.T., Palavra, A.F., and Mendes, R.L.,2007. *Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂*. Food Chemistry, **101**(2): p. 717-723.
- [21]Demirbas, A.,2005. *Hydrogen production from biomass via supercritical water extraction*. Energy Sources, **27**(15): p. 1409-1417.
- [22]Peter, S. and Brunner, G.,1982. *Process for decaffeinating coffee*: United States.
- [23]Basu, P. and Mettanan, V.,2009. *Biomass Gasification in Supercritical Water - A Review*. International Journal of Chemical Reactor Engineering, **7**.
- [24]Ponte, M.N.d.,1995. *Fluidos Supercríticos: Os Solventes "Verdes"*. DSpace at FCTUNL - Revista de Cultura Científica: p. 24-36.
- [25]Reid, R.C. and Kurnik, R.T.,1982. *Solubility of solid mixtures in supercritical fluids*. Fluid Phase Equilibria, **8**(1): p. 93-105.
- [26]González-Vila, F.J., Bautista, J.M., Gutiérrez, A., Del Rio, J.C., and González, A.G.,2000. *Supercritical carbon dioxide extraction of lipids from Eucalyptus globulus wood*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, **43**(1-3): p. 345-351.
- [27]Horiuchi, K., Shiota, S., Hatano, T., Yoshida, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T.,2007. *Antimicrobial Activity of Oleanolic Acid from Salvia officinalis and Related Compounds on Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE)*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, **30**(6): p. 1147-1149.
- [28]Fontanay, S., Grare, M., Mayer, J., Finance, C., and Duval, R.E.,2008. *Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes*. Journal of Ethnopharmacology, **120**(2): p. 272-276.
- [29]Wolska, K., Grudniak, A., Fiecek, B., Krackiewicz-Dowjat, A., and Kurek, A.,2010. *Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives*. Central European Journal of Biology, **5**(5): p. 543-553.
- [30]Liu, J.,1995. *Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid*. Journal of Ethnopharmacology, **49**(2): p. 57-68.
- [31]Liu, J.,2005. *Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives*. Journal of Ethnopharmacology, **100**(1-2): p. 92-94.
- [32]Shishodia, S., Majumdar, S., Banerjee, S., and Aggarwal, B.B.,2003. *Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappa B activation induced by carcinogenic agents through suppression of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: Correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1*. Cancer Research, **63**(15): p. 4375-4383.
- [33]Tian, Z., Lin, G., Zheng, R.X., Huang, F., Yang, M.S., and Xiao, P.G.,2006. *Anti-hepatoma activity and mechanism of ursolic acid and its derivatives isolated from Aralia decaisneana*. World Journal of Gastroenterology, **12**(6): p. 874-879.
- [34]Aggarwal, B.B. and Shishodia, S.,2006. *Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer*. Biochemical Pharmacology, **71**(10): p. 1397-1421.
- [35]Huang, M.T., Ho, C.T., Wang, Z.Y., Ferraro, T., Lou, Y.R., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J.D., and Conney, A.H.,1994. *Inhibition of Skin Tumorigenesis by Rosemary and Its Constituents Carnosol and Ursolic Acid*. Cancer Research, **54**(3): p. 701-708.
- [36]Gupta, M.B., Nath, R., Gupta, G.P., and Bhargava, K.P.,1981. *Anti-Ulcer Activity of Some Plant Triterpenoids*. Indian Journal of Medical Research, **73**(APR): p. 649-652.
- [37]Sosa, S., Altinier, G., Politi, M., Braca, A., Morelli, I., and Della Loggia, R.,2005. *Extracts and constituents of Lavandula multifida with topical anti-inflammatory activity*. Phytomedicine, **12**(4): p. 271-277.

- [38]Ramachandran, S. and Prasad, N.R.,2008. *Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes*. *Chemico-Biological Interactions*, **176**(2-3): p. 99-107.
- [39]Horiuchi, K., Shiota, S., Hatano, T., Yoshida, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T.,2007. *Antimicrobial activity of oleanolic acid from Salvia officinalis and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE)*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **30**(6): p. 1147-1149.
- [40]Kuethe, V., Eyong, K.O., Folefoc, G.N., Beng, V.P., Hussain, H., Krohn, K., and Nkengfack, A.E.,2007. *Antimicrobial activity of the methanolic extract and of the chemical constituents isolated from Newbouldia laevis*. *Pharmazie*, **62**(7): p. 552-556.
- [41]Mengoni, F., Lichtner, M., Battinelli, L., Marzi, M., Mastroianni, C.M., Vullo, V., and Mazzanti, G.,2002. *In vitro anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells*. *Planta Medica*, **68**(2): p. 111-114.
- [42]Tolstikova, T.G., Sorokina, I.V., Tolstikov, G.A., Tolstikov, A.G., and Flekhter, O.B.,2006. *Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **32**(1): p. 37-49.
- [43]Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., and Neto, C.P.,2002. *Identification of New Hydroxy Fatty Acids and Ferulic Acid Esters in the Wood of Eucalyptus globulus*. *Holzforschung*, **56**(2): p. 143-149.
- [44]Gutiérrez, A., Río, J.C.d., González-Vila, F.J., and Martín, F.,1999. *Chemical Composition of Lipophilic Extractives from Eucalyptus globulus Labill. Wood*. *Holzforschung*, **53**(5): p. 481-486.
- [45]Wang, L. and Weller, C.L.,2006. *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. *Trends in Food Science & Technology*, **17**(6): p. 300-312.
- [46]U.F.S.C. *Extração Sólido-Líquido*. 2010; Available from: <http://www.qmc.ufsc.br/organica/exp77/solido.html>.
- [47]Karasek, F.W. and Clement, R.E.,1988. *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Principles and Techniques*, ed. Elsevier, New York, USA.
- [48]Kitson, F.G., Larsen, B.S., and McEwen, C.N.,1996. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry- A Practical Guide*, ed. Academic Press Inc., San Diego, USA.
- [49]Forgács, E. and Cserhádi, T.,1997. *Molecular Basis of Chromatographic Separation*, ed. CRC Press, New York, USA.
- [50]Dass, C.,2007. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, ed. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- [51]Sjöström, E. and Alén, R.,1999. *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking*, ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- [52]Rose, M.E.,1982. *C. Merritt Jr and C. N. McEwen(EDS). Mass spectrometry, part B. Marcel Dekker, New York, 1980. \$49.75. Biological Mass Spectrometry*, **9**(5): p. iii-iv.
- [53]Blau, K. and Halket, J.,1993. *Handbook of Derivatives for Chromatography. 2ª*, ed. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- [54]Mathe, C., Culioli, G., Archier, P., and Vieillescazes, C.,2004. *Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, **1023**(2): p. 277-285.
- [55]Razboršek, M., Vončina, D., Doleček, V., and Vončina, E.,2008. *Determination of Oleanolic, Betulinic and Ursolic Acid in Lamiaceae and Mass Spectral Fragmentation of Their Trimethylsilylated Derivatives*. *Chromatographia*, **67**(5): p. 433-440.
- [56]Heinzen, H., de Vries, J.X., Moyna, P., Remberg, G., Martinez, R., and Tietze, L.F.,1996. *Mass Spectrometry of Labelled Triterpenoids: Thermospray and Electron Impact Ionization Analysis*. *Phytochemical Analysis*, **7**(5): p. 237-244.
- [57]Janicsák, G., Veres, Kállai, and Máthé,2003. *Gas Chromatographic Method for Routine Determination of Oleanolic and Ursolic Acids in Medicinal Plants*. *Chromatographia*, **58**(5): p. 295-299.

- [58]Burnouf-Radosevich, M., Delfel, N.E., and England, R.,1985. *Gas chromatography-mass spectrometry of oleanane- and ursane-type triterpenes--application to Chenopodium quinoa triterpenes*. *Phytochemistry*, **24**(9): p. 2063-2066.
- [59]Budzikiewicz, H., Wilson, J.M., and Djerassi, C.,1963. *Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII.1 Pentacyclic Triterpenes*. *Journal of the American Chemical Society*, **85**(22): p. 3688-3699.
- [60]Assimopoulou, A.N. and Papageorgiou, V.P.,2005. *GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of Pistacia species. Part II. Pistacia terebinthus var. Chia*. *Biomedical Chromatography*, **19**(8): p. 586-605.
- [61]Pöhler, H. and Kiran, E.,1997. *Volumetric Properties of Carbon Dioxide + Ethanol at High Pressures*. *Journal of Chemical & Engineering Data*, **42**(2): p. 384-388.
- [62]Zúñiga-Moreno, A. and Galicia-Luna, L.A.,2001. *Compressed Liquid Densities of Carbon Dioxide + Ethanol Mixtures at Four Compositions via a Vibrating Tube Densimeter up to 363 K and 25 MPa*. *Journal of Chemical & Engineering Data*, **47**(2): p. 149-154.
- [63]Suárez-Iglesias, O., Medina, I., Pizarro, C., and Bueno, J.L.,2007. *Diffusion of Benzyl Acetate, 2-Phenylethyl Acetate, 3-Phenylpropyl Acetate, and Dibenzyl Ether in Mixtures of Carbon Dioxide and Ethanol*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **46**(11): p. 3810-3819.
- [64]Hamburger, M., Baumann, D., and Adler, S.,2004. *Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants—effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances*. *Phytochemical Analysis*, **15**(1): p. 46-54.
- [65]Langenfeld, J.J., Hawthorne, S.B., Miller, D.J., and Pawliszyn, J.,1993. *Effects of temperature and pressure on supercritical fluid extraction efficiencies of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls*. *Analytical Chemistry*, **65**(4): p. 338-344.
- [66]Lloyd, L. and Kennedy, J.,1998. *W.P. Olson (ed.), Separations Technology – Pharmaceutical and Biotechnology Applications*. *Bioseparation*, **7**(1): p. 63-63.